

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

**Einfluss gezielter Mutationen
auf die biologische Aktivität des Oberflächen-Glykoproteins
eines afrikanischen Henipavirus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Laura Behner
aus Kassel

Marburg an der Lahn, 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2013 bis September 2017 im Institut für Virologie, Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Andrea Maisner durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)

als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Andrea Maisner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Uwe Maier

Prof. Dr. Susanne Önel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung	1
Summary	3
I Einleitung.....	4
1.1 Henipaviren	4
1.1.1 Virusaufbau von Henipaviren	4
1.1.2 Genomaufbau von Henipaviren	5
1.2 Flughunde als Henipavirus-Reservoir	6
1.3 Hendravirus-Infektionen.....	8
1.3.1 Hendravirus-Ausbrüche in Australien.....	8
1.3.2 Hendravirus-Impfstoff für Pferde	9
1.4 Nipahvirus-Infektionen	9
1.4.1 Erster Nipahvirus-Ausbruch 1998/99 in Malaysia.....	9
1.4.2 Aktuelle Nipahvirus-Ausbrüche	10
1.5 Henipavirus-Impfstoffe und Therapien für den Menschen	11
1.6 Das afrikanische Kumasivirus (KV)	12
1.6.1 Die Entdeckung neuer Henipaviren	12
1.6.2 Isolierung des Kumasivirus	13
1.6.3 Genomanalyse des Kumasivirus.....	16
1.7 Die Henipavirus Oberflächen-Glykoproteine G und F	18
1.7.1 Das Fusionsprotein F.....	18
1.7.2 Das Glykoprotein G	20
1.7.3 Die Rolle der henipaviralen Glykoproteine im Replikationszyklus	25
.....	26
1.8 Die Henipavirus-Rezeptoren Ephrin-B2 und -B3.....	26
1.9 Aufgabenstellung und Zielsetzung	28

II	Ergebnisse.....	30
2.1	Untersuchung der Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins.....	30
2.2	Untersuchung der Oberflächenexpression des KV-G Proteins.....	31
2.3	Intrazelluläre Lokalisation des KV-G Proteins	35
2.4	Charakterisierung der N-Glykosylierungsstellen im KV-G Protein	37
2.4.1	Nachweis von Mannose-reichen und komplexen Zuckerketten im KV-G37	
2.4.2	Charakterisierung von KV-G Glykosylierungsmutanten	40
2.4.3	Untersuchung der Fusionshelferaktivität der Glykosylierungsmutanten .	43
2.5	Charakterisierung der Cysteine in der Stieldomäne des KV-G Proteins.....	45
2.5.1	Untersuchungen zur KV-G Oligomerisierung	46
2.5.2	Charakterisierung der KV-G Stieldomänen-Mutanten	48
2.5.3	Fusionshelferaktivität der Cystein-Stieldomänen-Mutanten.....	50
	53
	54
2.6	Untersuchung eines nicht konservierten Endozytose-Motivs in der zytoplasmatischen Domäne des KV-G Proteins.....	54
2.6.1	Qualitativer Nachweis der Internalisierung durch einen <i>antibody uptake</i> Assay	55
2.6.2	Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Chlorpromazin- Behandlung der Zellen	57
2.6.3	Untersuchung der Ko-Endozytose von NiV-F und KV-G Proteinen.....	58
2.6.4	Quantifizierung der Endozytoserate von KV-G durch „MESNA-Reduktion“ 59	
2.6.5	Einfluss der Y38A Mutation auf die Oberflächenexpression von KV-G ..	61
2.6.6	Fusionshelferaktivität der Endozytose-Mutante KV-G _{Y38A}	62
2.7	Untersuchung der Doppelmutante KV-G _{Y38A+C314S}	63
2.7.1	Untersuchung der Kopfdomänen-Mutante KV-G _{C314S}	63
2.7.2	Charakterisierung der KV-G _{Y38A+C314S} Doppelmutante	64
III	Diskussion.....	66
3.1	Heterotypische Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins	66

3.2	Ineffizienter Oberflächentransport des KV-G Proteins.....	67
3.3	N-Glykane sind essentiell für den Transport und die Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins	68
3.4	KV-G bildet verstärkt hocholigomere Formen aus.....	69
3.5	Veränderungen im Oligomerisierungsmuster führen zum Verlust der Fusionshelferfunktion	71
3.6	Ein nicht konserviertes Endozytose-Motiv Y ₃₈ FGL verringert die Oberflächenexpression des KV-G Proteins	72
3.7	Die Kombination aus den Mutationen C314S und Y38A steigert die Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins signifikant	73
3.8	Charakterisierung der Funktion des KV-G Proteins im viralen Kontext.....	74
3.9	Identifikation neuer Henipaviren.....	75
3.10	Einschätzung des zoonotischen Potentials von KV	77
IV	Material	79
4.1	Materialien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	79
4.2	Enzyme	81
4.2.1	Restriktionsendonukleasen.....	81
4.3	Antikörper	82
4.3.1	Primärantikörper	82
4.3.2	Sekundärantikörper	82
4.4	Kits	82
4.5	Plasmide.....	83
4.6	Primer.....	84
4.6.1	Sequenzierungsprimer.....	84
4.6.2	Klonierungsprimer	84
4.6.3	Q5 <i>Site-Directed</i> -Mutageneseprimer	85
4.7	Zellen.....	86
4.7.1	Eukaryotische Zellen	86
4.7.2	Prokaryotische Zellen	86
4.8	Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen.....	86

4.9	Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen.....	87
4.10	Transfektionsreagenzien	87
4.11	Puffer	87
4.12	Inhibitoren	90
4.13	Mowiol.....	91
V	Methoden.....	92
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	92
5.1.1	Tfb- und Hitzeschocktransformation	92
5.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	93
5.1.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	93
5.1.4	Präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	94
5.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	95
5.1.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	96
5.1.7	Ligation.....	96
5.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	97
5.1.9	Mutagenese Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	99
5.2	Zellbiologische Methoden	101
5.2.1	Zellkultur permanenter Zelllinien	101
5.2.2	Zellzahlbestimmung.....	101
5.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	102
5.2.4	Aussäen von Zellen in 24- und 6-well-Vertiefungen	102
5.2.5	Transfektion mittels Lipofectamine™2000.....	103
5.2.6	Transfektion mittels FuGENE HD	103
5.2.7	Fusionsassay.....	104
5.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	104
5.3.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	104
5.3.2	<i>Antibody Uptake Assay</i>	106
5.3.3	Biotinylierung von Membranproteinen auf der Zelloberfläche.....	107

5.3.4	Quantitativer Endozytosenachweis durch Oberflächenbiotinylierung und MESNA-Reduktion	109
5.3.5	Immunpräzipitation	112
5.3.6	SDS-PAGE	112
5.3.7	Proteintransfer auf Nitrozellulose mittels Elektroblothing (<i>Semi-Dry-Blot</i>) 114	
5.3.8	Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose	115
5.3.8.1	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	115
5.3.8.2	Nachweis biotinylierter Membranproteine mittels Streptavidin	116
5.3.9	Metabolische Markierung von Proteinen (<i>Pulse Chase</i>).....	116
5.3.10	Endoglykosidase-Behandlung metabolisch markierter Proteine.....	117
5.3.11	Bestimmung der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	118
VI	Literaturverzeichnis	120
	Anhang	132
A1	Abkürzungsverzeichnis	132
A2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	135
A3	Publikationsliste.....	139
A4	Danksagung	142
A5	Erklärung	143

Zusammenfassung

Hendra- und Nipahviren stellen die beiden hochpathogenen Vertreter des Genus Henipavirus dar. Ihr natürlicher Wirt sind Flughunde der Gattung *Pteropus*. Während die Infektion in Flughunden asymptomatisch verläuft, verursachen Henipaviren in Menschen und anderen Säugetieren, wie Schweinen oder Pferden, schwerwiegende Infektionen und gehören deshalb zu den sogenannten BSL-4 Erregern. Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, dass das Vorkommen der Henipaviren auf Südostasien und Australien beschränkt ist. Inzwischen gibt es jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass das Verbreitungsgebiet der Henipaviren deutlich größer ist. So wurden beispielsweise in Westafrika (Ghana) Henipavirus-ähnliche RNA-Sequenzen aus Flughunden der Spezies *Eidolon helvum* isoliert. Eines dieser afrikanischen Henipaviren, Kumasivirus (KV), konnte vollständig sequenziert werden. Da jedoch bis heute kein vermehrungsfähiges Virus aus Flughunden isoliert werden konnte, kann das zoonotische Potential neuer Henipaviren nur durch die funktionelle Charakterisierung einzelner viraler Proteine im Vergleich zu den homologen Proteinen bekannter humanpathogener Henipaviren abgeschätzt werden.

Die beiden viralen Oberflächenproteine G und F sind für den Eintritt von Henipaviren in Wirtszellen und ihre Ausbreitung auf Nachbarzellen von zentraler Bedeutung. Nur wenn das G-Protein erfolgreich an seinen zellulären Rezeptor gebunden hat und seine sogenannte Fusionshelferfunktion ausübt, kann das F-Protein die Virus-Zell- oder die Zell-Zell-Fusion einleiten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression und die Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins im Vergleich zu anderen Henipavirus Glykoproteinen deutlich reduziert ist. Um die Ursache hierfür aufzuklären, wurde in dieser Arbeit das KV-G Protein im Vergleich zum G-Protein des pathogenen Nipahvirus (NiV-G) auf molekularer Ebene charakterisiert. Dafür wurden verschiedene Mutationen in das Protein eingefügt, die das N-Glykosylierungsmuster, die Oligomerisierung oder die Endozytose des Proteins beeinflussten. Western Blot Analysen, metabolische Markierungen sowie funktionelle Fusionsassays ergaben, dass das KV-G Protein, wie auch das NiV-G, sechs N-Glykane besitzt, die alle für den Oberflächentransport und die biologische Aktivität essentiell sind. Die Oligomerisierung des KV-G Proteins scheint sich jedoch von der des NiV-G Proteins zu unterscheiden. KV-G wird nicht in einem ausgewogenen Dimer-Tetramer-Verhältnis exprimiert, sondern bildet hauptsächlich hocholigomere Formen aus. Cystein-Mutationen in der Stiel-domäne des KV-G Proteins führten zwar zu einer Veränderung des Oligomerisierungsmusters, allerdings konnte weder die Oberflächenexpression noch

die Fusionshelferfunktion verbessert werden. Interessanterweise führte jedoch die Mutation eines nicht konservierten Cysteins in der Kopfdomäne zu einer signifikant gesteigerten Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins. Die Aktivität konnte weiter gesteigert werden, wenn zusätzlich das Endozytose-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne zerstört wurde.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine signifikant gesteigerte Aktivität (*gain of function*) eines Glykoproteins eines afrikanischen Henipavirus nachgewiesen werden. Auch wenn die biologische Aktivität des KV-G Proteins im Vergleich zu Glykoproteinen hochpathogener Henipaviren immer noch stark eingeschränkt ist, muss davon ausgegangen werden, dass durch wenige adaptive Punktmutationen afrikanische Henipaviren mit gesteigerter Funktion und damit eventuell höherem zoonotischen Potential entstehen können.

Summary

Hendra virus and Nipah virus are the two highly pathogenic representatives of the genus henipavirus. Fruit bats of the genus *Pteropus* serve as their natural reservoir. While bats do not show any clinical symptoms upon infection, henipaviruses can cause severe illness after natural spillover to humans, pigs or horses. Due to their zoonotic potential and high pathogenicity, henipaviruses are classified as BSL-4 pathogens. Initially, henipaviruses were believed to be restricted to Southeast Asia and Australia. But in recent years, there is increasing evidence of a much broader geographic distribution because henipaviral RNA has been identified also in Africa. One of these African bat henipaviruses, Kumasi virus (KV), isolated from an *Eidolon helvum* fruit bat in Ghana, could be fully sequenced. Since isolation of infectious viruses was not successful so far, evaluation of the zoonotic potential of new viruses is based on functional analyses of individual viral surface proteins in comparison to their pathogenic homologues from Nipah or Hendra viruses.

The receptor-binding G protein and the fusion protein F are central determinants for virus entry and cell-to-cell spread. Efficient binding to cellular receptors and fusion-helper function of henipavirus G proteins are essentially required to support F-mediated virus-cell and cell-cell-fusion processes. It has been shown earlier that surface expression and fusion-helper activity of KV-G is clearly reduced compared to the G protein of pathogenic NiV (NiV-G). To gain insight into the molecular determinants affecting protein transport and function, several KV-G mutants resulting in changes in N glycosylation, oligomerization and endocytosis pattern were generated. Western Blot analysis, metabolic labeling and functional fusion assays revealed that, similar to NiV-G, KV-G contains six N glycans which are all required for surface transport and functionality. However, KV-G differs in its oligomerization by almost exclusively forming stable tetramers, while NiV-G is expressed in a well-balanced dimer-tetramer ratio. Although cysteine mutations in the stalk domain of KV-G altered the oligomerization pattern, neither surface transport nor fusion-helper activity was improved. However, when mutating a non-conserved cysteine in the globular head domain of KV-G some gain of function was observed. This was further increased when we additionally disrupted an endocytosis motive in the cytoplasmic domain. This work shows for the first time an African henipavirus glycoprotein with enhanced functionality. Although the bioactivity is still far below that of highly pathogenic henipavirus G proteins, this indicates that African henipaviruses with improved fusion-helper function and perhaps an increased zoonotic potential might evolve by just a few adaptive mutations.

I Einleitung

1.1 Henipaviren

Henipaviren sind umhüllte Viren, die ein nicht segmentiertes, einzelsträngiges und in Negativstrang-Orientierung vorliegendes RNA-Genom besitzen, das für nur sechs Strukturproteine kodiert (siehe Abb. 1.1). Sie gehören zur Familie der *Paramyxoviridae* und zur Ordnung der Mononegavirales (Murphy *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000). Das Genus Henipavirus besteht aus den folgenden Spezies: Hendravirus (HeV), Nipahvirus (NiV), Cedar Henipavirus (CedV), Ghanaian bat Henipavirus (Kumasivirus; KV) und Mojiang Henipavirus (MojV) (Afonso *et al.*, 2016). Während CedV nicht humanpathogen ist (Marsh *et al.*, 2012), stellen NiV und HeV die hochpathogenen Vertreter der Henipaviren dar, die der biologischen Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) zugeordnet werden (Wang *et al.*, 2000). MojV ist das erste Henipavirus, welches aus Nagetieren in China isoliert wurde (Wu *et al.*, 2014), und KV gilt als erstes afrikanisches Henipavirus (Drexler *et al.*, 2012). Henipaviren, insbesondere die hochpathogenen Hendra- und Nipahviren, zeichnen sich durch ihr großes Wirtsspektrum aus. Neben Schweinen, Menschen und Pferden können auch Affen, Frettchen, Hamster, Hunde, Katzen oder Meerschweinchen infiziert werden (Parashar *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003; Mungall *et al.*, 2007; Broder *et al.*, 2012).

1.1.1 Virusaufbau von Henipaviren

Henipaviren sind umhüllte Viren mit einem helikalen Nukleokapsid. Infektiöse Viruspartikel werden als pleomorph beschrieben, d.h. sie können sowohl in filamentöser als auch in sphärischer Form vorliegen. Ihre Partikelgröße variiert zwischen 40 und 600 nm, mit einer durchschnittlichen Größe von 500 nm (Hyatt *et al.*, 2001; Goldsmith *et al.*, 2003). Die Virushülle stammt von der Membran der infizierten Wirtszelle ab. Sie wird während des *budding*-Prozesses, der Abknospung des Viruspartikels, abgeschnürt und mitgenommen. In diese Virushülle sind die beiden Oberflächen-Glykoproteine G und F eingelagert. Während das Glykoprotein G die wichtige Aufgabe der Rezeptorbindung und der Fusionshelferfunktion übernimmt, leitet das Fusionsprotein F die Fusion der Virus-Zellmembran und später der Zell-Zellmembran ein. Das Matrixprotein M kleidet die Innenseite der Virushülle aus. Es stellt die Verbindung der Virushülle mit dem innenliegenden, helikalen Nukleokapsid her. Das Nukleokapsid besteht aus dem einzelsträngigen (*single-stranded, ss*), nicht-segmentierten RNA-Genom, welches von dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein

(P) und der viralen Polymerase (L) enkapsidiert wird (siehe Abb. 1.1; Wang *et al.*, 2001).

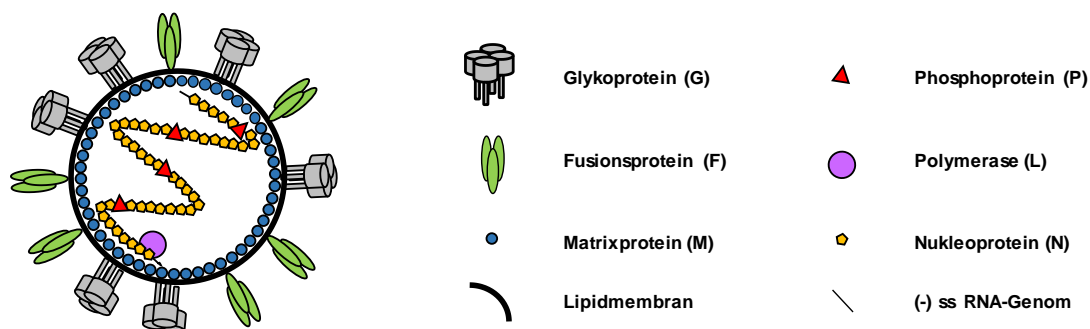


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Henipaviren. Modifiziert nach Diederich, 2007.

1.1.2 Genomaufbau von Henipaviren

Henipaviren besitzen ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom, welches in negativer Orientierung vorliegt. Das NiV-Genom hat eine Länge von 18.246 Basen und unterscheidet sich damit in seiner Länge lediglich um 12 Basenpaare vom HeV-Genom (Chan *et al.*, 2001). Im Vergleich zu anderen Paramyxoviren sind ihre Genome jedoch um etwa 2,7 kb länger (Wang *et al.*, 2001; Harcourt *et al.*, 2000). Beide Genome erfüllen die *rule of six*, was bedeutet, dass die Nukleotidanzahl einer genau durch sechs teilbaren Zahl entspricht (Egelman *et al.*, 1989). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Replikation des Virus-Genoms, da ein Nukleoprotein-Monomer genau sechs Nukleotide enkapsidiert. Außerdem ist die Aktivität des Promotors am 3'-Ende des Genoms abhängig von der relativen Lage zu den NP-Monomeren (Calain und Roux, 1993; Vulliémoz und Roux, 2001; Halpin *et al.*, 2004). Die Genomorganisation der Henipaviren entspricht der aller Paramyxoviren (siehe Abb. 1.2): Am 3'-Ende befindet sich eine nicht kodierende *leader*-Sequenz, die der Initiation der Replikation sowie als Promotor für die Synthese der Positiv-Strang-RNA dient (Wang *et al.*, 2000). Anschließend folgen die kodierenden Bereiche für die sechs Strukturproteine N, P, M, F, G und L. Das P-Gen kodiert durch Verwendung eines alternativen Startkodons bzw. *RNA-editing* zusätzlich für die drei Nichtstrukturproteine C, V und W (Harcourt *et al.*, 2000; Lamb und Kolakofsky, 2001). Zwischen den einzelnen Genen befinden sich jeweils konservierte, nichtkodierende, intergenische Regionen (Wang *et al.*, 2000). Am 5'-Ende des Genoms liegt eine 29 Nukleotid lange *trailer*-Sequenz, welche für die Verpackung des Genoms in neu entstehende Viruspartikel essentiell ist (Walpita und Peters, 2007).

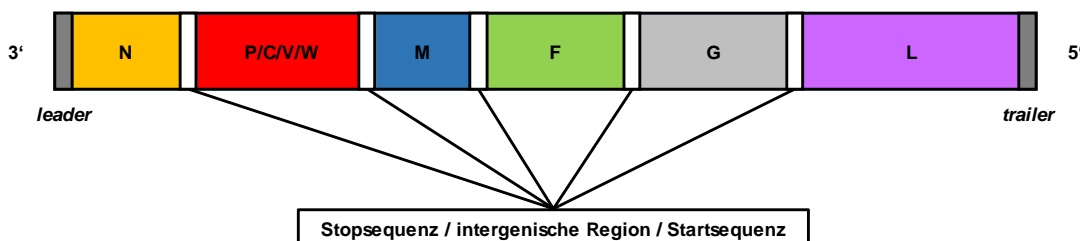


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Genomaufbaus von Henipaviren. N = Nukleoprotein; P = Phosphoprotein (C, V, W: Nichtstrukturproteine); M = Matrixprotein; F = Fusionsprotein; G = Glykoprotein; L = Polymerase. Modifiziert nach Harcourt *et al.*, 2000.

1.2 Flughunde als Henipavirus-Reservoir

Sowohl für HeV als auch für NiV, die in Australien bzw. Malaysia und Indien vorkommen, wurden Flughunde der Gattung *Pteropus* als das natürliche Virusreservoir identifiziert. In verschiedenen Flughund-Spezies konnten neutralisierende Antikörper gegen HeV bzw. NiV detektiert werden (Young *et al.*, 1996; Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002). Zudem zeigten Sequenzanalysen, dass die HeV-Isolate aus Flughunden in Australien eine hohe Analogie zu den Isolaten aus Menschen und Pferden aufweisen (Halpin *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2011). Ähnliche Ergebnisse ergab ein Sequenzvergleich der NiV-Isolate aus Flughunden und Menschen in Malaysia (Shirai *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnte bis heute kein NiV-Isolat aus Flughunden in Bangladesch oder Indien isoliert werden, in denen regelmäßig kleinere NiV-Ausbrüche dokumentiert werden. Hier konnte lediglich der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen NiV in Flughunden erbracht werden (Hsu *et al.*, 2004; Epstein *et al.*, 2008). Flughunde, die natürlich oder experimentell mit Henipaviren infiziert werden, zeigen keine klinischen Symptome einer Infektion, obwohl sich das Virus in ihnen sehr effizient replizieren kann. Verschiedene tierexperimentelle Studien belegen, dass das Immunsystem der Flughunde Antikörper als Antwort auf die Infektion bildet (Eaton *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2007, Halpin *et al.*, 2011). Die Dynamik der Übertragung und Ausbreitung der Henipaviren zwischen verschiedenen Flughunden in der Natur ist bis heute noch nicht vollständig verstanden, jedoch weisen einige Daten darauf hin, dass die aus Tierexperimenten gewonnen Ergebnisse mit denen aus der Natur übereinstimmen: Eine Virusvermehrung scheint nur innerhalb der ersten Tage nach der Infektion mit geringem Virustiter stattzufinden. So konnten HeV oder NiV lediglich zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion (7 Tage nach der Infektion), aber nicht zu späten Zeitpunkten (22 bis 23 Tagen nach der Infektion) aus Flughunden isoliert werden, was auf eine sehr kurze virämische Phase hindeutet (Williamson *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2007). Sehr wahrscheinlich wird das Virus über Ausscheidungen wie Urin oder Kot

auf andere Flughunde übertragen (Middleton *et al.*, 2007; Halpin *et al.*, 2011). Ferner deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die Infektion von Flughunden mit HeV und NiV periodisch, jedoch selten stattfindet (Chua *et al.*, 2002; Field *et al.*, 2011; Halpin *et al.*, 2011). Ein Faktor, der Flughunde zu einem attraktiven Viruswirt macht, ist die Tatsache, dass sie in großen Gruppen zusammenleben. Teilweise können bis zu über 1.000.000 Tiere in einer einzigen Höhle gefunden werden. Diese räumliche Nähe der Tiere begünstigt die Übertragung von Viren erheblich (Drexler *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass Flughunde über viele Kontinente verteilt leben und einige Spezies zum Überwintern auf andere Kontinente fliegen, fördert die saisonale Virusübertragung und deren Ausbrüche (Wang *et al.*, 2011).

Henipaviren können in den Ausscheidungen der Flughunde (Urin, Fäkalien oder Speichel) mehrere Tage lang infektiös bleiben (Fogarty *et al.*, 2008). So können sie auf verschiedene Säugetierarten, u.a. auf Menschen, übertragen werden (Wong *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2011). Neben Henipaviren persistieren in Flughunden auch andere hochpathogene Viren, wie beispielsweise Ebola-, Rabies-, Lyssa- oder SARS-Corona Viren. Bis heute ist noch wenig über das Immunsystem von Flughunden bekannt und es ist unklar, warum diese Tiere keine klinischen Symptome als Antwort auf solche, für den Menschen teilweise hochpathogenen, Virusinfektionen zeigen. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich Flughunde als eine der frühesten Säugetierarten gemeinsam mit den Viren ko-evolutionär entwickelt haben. Im Gegensatz zu anderen Säugetierarten zeigen Flughunde nur wenige evolutionäre Veränderungen, weshalb sie wahrscheinlich immer noch als Viruswirt geeignet sind (Calisher *et al.*, 2006). So besitzt das angeborene Immunsystem der Flughunde beispielsweise andere Eigenschaften als das Immunsystem des Menschen, was es möglicherweise erleichtert, eine massive Virusvermehrung zu unterdrücken (Calisher *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013). Auch das erworbene Immunsystem unterscheidet sich stark. Flughunde besitzen Röhrenknochen, um ihr Körpergewicht für das Fliegen möglichst gering zu halten. Das führt jedoch dazu, dass sie kein Knochenmark haben, welches bei Säugetieren sonst für die Produktion der B-Zellen und somit für die Antikörperbildung zuständig ist. Es wird spekuliert, dass das Knochenmark im Becken dieses Defizit kompensiert, in dem es verstärkt B-Zellen bildet (Dobson *et al.*, 2005). Letztendlich ist die Antikörperbildung aber im Vergleich zu anderen Säugetieren verzögert (Chakraborty und Chakravarty, 1983).

Eine besondere Eigenschaft von Flughunden ist ihre Flugfähigkeit (Calisher *et al.*, 2006). Da das Fliegen sehr viel Energie verbraucht, muss der Stoffwechsel während des Fluges erheblich (um das 15-fache) gesteigert werden (Brook und Dobson, 2015).

Neuere Studien konnten zeigen, dass die Körpertemperatur der Flughunde während des Fliegens stark ansteigt, was dazu führen könnte, dass das Immunsystem dauerhaft hochreguliert ist. Die Körpertemperatur während des Fliegens entspricht der menschlichen Körpertemperatur während einer Fieberphase (38 - 41 °C) (O'Shea *et al.*, 2014; Brook und Dobson, 2015). Da Flughunde fast täglich fliegen, ist ihr Immunsystem möglicherweise ständig überaktiviert, was erklären könnte, warum viele virale Infektionen in Flughunden asymptomatisch verlaufen (O'Shea *et al.*, 2014). Andere Studien zeigen, dass während des Winterschlafs sowohl der Herzschlag als auch die Atmung und die Körpertemperatur der Flughunde rapide heruntergefahren wird, um Energie zu sparen. Gleichzeitig wird der Stoffwechsel verlangsamt. Als Folge könnte die Immunantwort der Flughunde reduziert sein, was dann zu einer verzögerten Viruseliminierung führen könnte. Auf diese Weise können Viren in Flughunden während des Winters persistieren und unter für Transmissionen günstigeren Bedingungen, wie beispielsweise saisonbedingte Koloniebildung, wieder hervorkommen (Sulkin und Allen *et al.*, 1974; George *et al.*, 2011; Moratelli und Calisher, 2015).

1.3 Hendravirus-Infektionen

1.3.1 Hendravirus-Ausbrüche in Australien

Im Jahr 1994 erkrankten mehrere Pferde an zwei verschiedenen Orten in Australien an einer bis dahin noch unbekannten, tödlich verlaufenden Krankheit. Neben den 21 Pferden, von denen 14 verstarben, infizierten sich auch zwei Pferdetrainer, von denen nur einer überlebte (Murray *et al.*, 1995). Später gelang es, ein Virus als Auslöser für die respiratorische, neurologische und mit Fieber verbundene Erkrankung zu identifizieren, welches nach dem Ort des Ausbruchs Hendra benannt wurde (Field *et al.*, 2000). Zwar ist die genaue Übertragungsrouten bis heute noch nicht bekannt, jedoch wird davon ausgegangen, dass sich die Pferde durch Fäkalien von Flughunden oder den Verzehr von HeV-kontaminierten Früchten infiziert haben (Hess *et al.*, 2011).

Nach den ersten Ausbrüchen 1994 kommt es seit 2006 immer wieder zu regelmäßigen HeV-Ausbrüchen in Australien, bei denen mehrere Tiere verstarben (Broder *et al.*, 2012). Der letzte registrierte Ausbruch fand im Juli 2016 statt. Hier infizierten sich über 70 Tiere und 7 Menschen (WHO; <http://www.who.int/csr/disease/hendra/en/>). Die Übertragung auf den Menschen findet nur in seltenen Fällen statt, da hierfür ein direkter Kontakt der Menschen mit infiziertem Material wie Blut oder Exkrementen der infizierten Pferde gegeben sein muss (CDC; *Center for Disease Control and*

Prevention, 1999). Es gibt bis heute noch keine Hinweise darauf, dass eine Übertragung von Mensch zu Mensch oder Flughund zu Mensch möglich ist (Selvey *et al.*, 1995).

1.3.2 Hendravirus-Impfstoff für Pferde

Seit Ende 2012 ist der Impfstoff Equivac® für Pferde zugelassen. Hierbei handelt es sich um eine Subunitvakzine, die das Oberflächenprotein HeV-G enthält (Mire *et al.*, 2014). Bis heute gilt es als die effektivste Möglichkeit, Pferde gegen HeV-Infektionen zu schützen. Erste Studien konnten zeigen, dass alle vakzinierten Pferde einen vollkommenen Schutz gegenüber HeV aufgebaut haben. Weder eine Infektion noch eine Virusübertragung oder -verbreitung konnten nachgewiesen werden (Mire *et al.*, 2014; <http://www.horsecouncil.org> A). Durch die Gabe des Impfstoffes soll der Übertragungsweg vom Flughund über das Pferd zum Menschen unterbrochen werden, sodass zeitgleich ein Schutz des Menschen erzielt werden kann (<http://www.horsecouncil.org> B).

1.4 Nipahvirus-Infektionen

1.4.1 Erster Nipahvirus-Ausbruch 1998/99 in Malaysia

Im Zeitraum von September 1998 bis Mai 1999 kam es in Malaysia und Singapur zu vermehrten Fällen von fieberigen Enzephalitiden. Die Anzahl der erkrankten Personen betrug 276, von denen 106 Menschen verstarben. Damit lag die Mortalitätsrate bei knapp 40 % (Chua *et al.*, 2003). Auffällig war, dass diesen Ausbrüchen respiratorische Erkrankungen von Schweinen vorausgingen (Mohd Nor *et al.*, 2000). Interessanterweise erkrankten hauptsächlich Männer, die aus beruflichen Gründen, beispielweise als Schlachter, in Kontakt zu Schweinen standen (Chua *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte ein direkter Bezug der geographischen Ausbreitung der Krankheit zu dem Transport von Schweinen beobachtet werden (Mohd Nor *et al.*, 2000). Im März 1999 konnte der bis dahin unbekannte Erreger aus dem Liquor eines Patienten isoliert werden. Das Virus wurde nach dem Wohnort des Patienten *Kampung Sungai Nipah village* benannt (Chua *et al.*, 1999). Es zeigte starke molekulare und antigenische Analogien zu dem Hendravirus, welches 1994 in Australien identifiziert wurde (Chua *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Es wird davon ausgegangen, dass sich die Schweine entweder durch den Verzehr von Früchten, welche zuvor von infizierten Flughunden angefressen wurden, oder durch Ausscheidungen der Flughunde infizierten. Der Übertragungsweg scheint dem der HeV-Transmission von Flughunden auf Pferde zu gleichen (Wong *et al.*, 2002). Wahrscheinlich führte das Eingreifen des Menschen in

den Lebensraum der Flughunde, wie beispielsweise durch das Abholzen von Wäldern, dazu, dass sich die Lebensräume von Flughunden und Nutztieren in Malaysia immer weiter annäherten (Chua *et al.*, 2002). Da die Schweine auf engstem Raum gehalten wurden, konnte sich das Virus sehr schnell und effizient innerhalb einer Farm ausbreiten. Der Transport infizierter Schweine zu entfernt gelegenen Schlachthöfen begünstigte dann die Ausbreitung in anderen Regionen des Landes (Field *et al.*, 2011).

NiV-infizierte Schweine entwickeln eine akute, hochkontagiöse, respiratorische Erkrankung, die als „Brüllhusten“ bezeichnet wird (Middleton *et al.*, 2002). Sie besitzt eine geringe Mortalität, jedoch eine hohe Morbidität (Chua *et al.*, 2000). Obwohl die Krankheit in Schweinen oft asymptomatisch verlief, wurde das Virus trotzdem durch den engen Kontakt zwischen Mensch und Schwein, beispielsweise bei der Schlachtung, effizient übertragen (Tan *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2000; Weingartl *et al.*, 2005). Eine weitere Ausbreitung der Erkrankung konnte im Jahr 1999 nur dadurch verhindert werden, dass über 1.000.000 Schweine gekeult wurden (CDC; 1999). Ein zusätzliches Verbot des Schweinetransports von Malaysia nach Singapur konnte dort ebenfalls die Anzahl an Krankheitsfällen verringern (Enserink, 1999). Obwohl das Virus seit 1999 in den Schweinepopulationen immer noch endemisch ist, sind bislang keine weiteren klinischen Fälle im Menschen aufgetreten (Center for Food Security and Public Health, 2007).

1.4.2 Aktuelle Nipahvirus-Ausbrüche

Seit 2001 kommt es in Bangladesch und seit 2002 in Indien zu regelmäßigen, kleineren NiV-Ausbrüchen (Butler, 2004; Enserink, 2004). In Bangladesch wird fast jährlich von neuen Ausbrüchen berichtet. Da die erkrankten Personen keinen Kontakt zu Schweinen haben, wird davon ausgegangen, dass die Übertragung direkt vom Flughund auf den Menschen stattfindet (Choi *et al.*, 2004; Montgomery *et al.*, 2008). In einigen Fällen kommt es auch zu Mensch-zu-Mensch Übertragungen (Anonymous *et al.*, 2004; Luby *et al.*, 2009). Die Mortalitätsrate liegt hier mit 60 % deutlich höher als bei den früheren Ausbrüchen in Malaysia (Gurley *et al.*, 2007). Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Verzehr von kontaminiertem rohem Palmsaft für die Übertragung verantwortlich ist. Die Gewinnung des Safts erfolgt durch das Anritzen der Palmrinde und wird anschließend in befestigten Gefäßen gesammelt. Über Ausscheidungen von NiV-infizierten Flughunden, die aus diesen Gefäßen trinken, gelangt das Virus in den Palmsaft (Luby *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Das Virus kann darin bis zu sieben Tage infektiös bleiben. Eine experimentelle Studie zeigte, dass sich Hamster durch den

Verzehr dieses kontaminierten Palmsaftes infizieren können (de Wit *et al.*, 2014). Inzwischen gilt die Aufklärung der Bevölkerung und das Anbringen von Schutzmatte über den Palmsaft-Sammelstellen als eine der wichtigsten Präventionsmaßnahmen.

Neben den Ausbrüchen in Bangladesch gibt es auch Hinweise auf einen Henipavirus-Ausbruch auf den Philippinen im Jahr 2014, bei dem es sowohl zu Pferd-zu-Mensch als auch zu Mensch-zu-Mensch-Übertragungen kam. Obwohl das Virus, welches zu diesem Ausbruch führte bis heute noch nicht komplett charakterisiert wurde, deuten die Ergebnisse aus RT-PCR-Analysen darauf hin, dass es sich hierbei um NiV handelt (Ching *et al.*, 2015).

1.5 Henipavirus-Impfstoffe und Therapien für den Menschen

Bis heute gibt es für den Menschen weder einen zugelassenen Impfstoff noch eine antivirale Therapie gegen eine henipavirale Infektion. Jedoch gibt es mehrere vielversprechende Ansätze, welche experimentell in Tiermodellen getestet wurden. So zeigten beispielsweise Chong und Kollegen, dass die Gabe von Ribavirin das Mortalitätsrisiko von infizierten Meerkatzen um 36 % senken kann (Chong *et al.*, 2001). In neueren Studien konnte diese Ergebnisse jedoch nicht verifizieren werden. Rockx und Kollegen konnten 2010 durch die Gabe von Ribavirin die Lebenszeit der Tiere lediglich verlängern, den Tod jedoch nicht verhindern (Rockx *et al.*, 2010). Die Impfung von Schweinen mit einer rekombinanten Canarypox-Vakzine, welche die Oberflächenproteine NiV-G und -F exprimiert, verringerte die Virusreplikation in diesen Tieren. Die Virusausbreitung über die Schleimhäute wurde eingedämmt, was die Ansteckung weiterer Tiere reduzierte (Weingartl *et al.*, 2006). Weitere Studien zeigen eine langanhaltende und schützende Wirkung des Immunsystems als Antwort auf die Gabe eines Adenovirus-assoziierten Vektors, welcher das Glykoprotein G von NiV exprimiert. Hierbei konnte sogar eine Kreuzimmunität mit HeV gezeigt werden (Ploquin *et al.*, 2013). Andere Studien ergaben, dass ein monoklonaler Antikörper, welcher gegen die Rezeptorbindedomäne des NiV-G und HeV-G gerichtet ist (Rockx *et al.*, 2010), sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* (Frettchen) zum Schutz vor einer HeV- oder NiV-Infektion eingesetzt werden kann (passive Immunisierung) (Bossart *et al.*, 2009). Neuste Studien beschreiben die vielversprechende Wirkung eines humanen monoklonalen Antikörpers (m102.4). Wird dieser Grünen Meerkatzen, welche zuvor mit NiV infiziert wurden, in zweifacher Dosis verabreicht, so überlebten alle Tiere, selbst wenn die Gabe erst 5 Tage nach der Infektion erfolgte (Geisbert *et al.*, 2014). Diese

Studie beschreibt zum ersten Mal eine Post-Expositions-Therapie bei einer Henipavirus-Infektion.

1.6 Das afrikanische Kumasivirus (KV)

1.6.1 Die Entdeckung neuer Henipaviren

Auf Grund der Tatsache, dass Henipaviren zunächst nur aus Flughunden der Gattung *Pteropus* isoliert werden konnten, ist man davon ausgegangen, dass die Ausbreitung der Viren auf die geographische Verbreitung dieser Flughunde, d.h. auf den südostasiatischen Raum und Australien, beschränkt ist (Hayman *et al.*, 2008). In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass das Verbreitungsgebiet von Flughunden der Familie *Pteropodidae* weitaus größer ist und beispielsweise große Teile des afrikanischen Kontinents mit einbezieht (vgl. Abb. 1.3). In Afrika konnten zwar bisher keine fruchtfressenden Flughunde der Gattung *Pteropus* gefunden werden, jedoch ist hier der Palmenflughund (*Eidolon helvum*) stark verbreitet (O'Brien, 2011). Studien konnten kreuzreagierende Antikörper gegen NiV und HeV in diesen Flughunden in Westafrika (Ghana) nachweisen (Hayman *et al.*, 2008). Einige Jahre später gelang es der Gruppe darüber hinaus kreuzreagierende Antikörper gegen Henipaviren auch in Schweinen in Ghana zu detektieren (Hayman *et al.*, 2011). Diese serologischen Befunde deuteten bereits darauf hin, dass Henipaviren ein größeres als bisher angenommenes Verbreitungsgebiet besitzen. Die Arbeitsgruppe von Christian Drosten und Jan Felix Drexler konnte in einer breit angelegten Studie dann Hinweise auf die Existenz weiterer, bisher nicht bekannter Henipaviren erlangen. Dabei konnten sie unter anderem aus *E. helvum* Flughunden in Ghana eine Vielzahl an Henipavirus-ähnlichen RNA-Sequenzen isolieren und identifizieren (Drexler *et al.*, 2009). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Henipaviren auch andere Genera der Familie *Pteropodidae* und sogar Fledermäuse (*Microchiroptera*) infizieren können. In Madagaskar konnten mit serologischen Nachweisverfahren Henipavirusinfektionen in drei verschiedenen Flughundspezies identifiziert werden (Iehlé *et al.*, 2007). Außerdem gibt es Hinweise auf ein Henipa-ähnliches Virus, welches in Flughunden und Fledermäusen in China zirkulieren soll. Hier konnten Antikörper gegen Henipaviren in Fledermäusen (*Myotis daubentonii*) nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014). Diese epidemiologischen Studien deuten auf eine bisher weit unterschätzte, geographische Ausbreitung der Henipaviren hin (Drexler *et al.*, 2009).

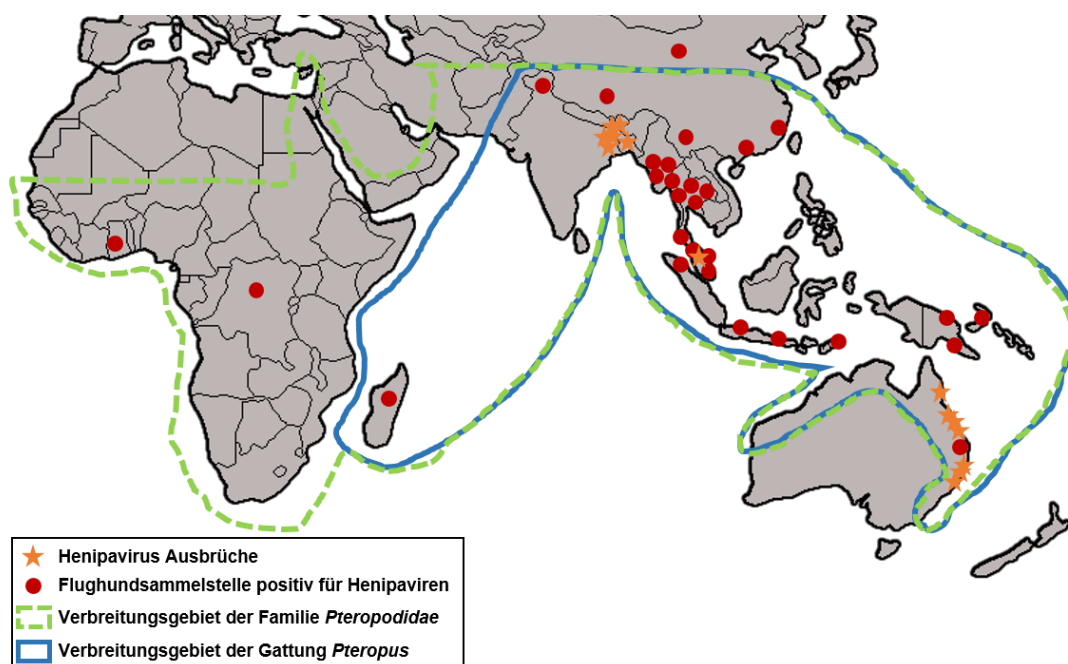


Abb. 1.3: Geographische Verbreitung der Henipavirus-Ausbrüche und der Flughunde der Familie der *Pteropodidae*. Die Sterne (orange) weisen auf die Orte hin, in denen Henipavirus-Ausbrüche in den Jahren 1997-2008 stattfanden. Die roten Punkte zeigen die Fundorte von Henipavirus-positiven fruchtfressenden Flughunden. Die grüne, gestrichelte Linie umrandet das Verbreitungsgebiet der Flughunde der Familie *Pteropodidae*. Die blaue Linie zeigt das Verbreitungsgebiet der Flughunde der Gattung *Pteropus*.

Modifiziert nach: http://www.who.int/csr/disease/nipah/Global_NiphaandHendraRisk_20090510.png

1.6.2 Isolierung des Kumasivirus

Flughunde der Gattung *Eidolon* zählen zur Familie der *Pteropodidae* und stellen den zweitgrößten Flughund auf dem afrikanischen Kontinent dar. Hier liegt sein Verbreitungsgebiet vornehmlich südlich der Sahara. Neben Höhlen bieten auch große Bäume den Flughunden Lebensraum, in denen sie sich tagsüber aufhalten können (vgl. Abb. 1.4). Die Tiere leben in sehr großen Gruppen von bis zu 1.000.000 Tieren zusammen. Setzt die Dämmerung ein, begeben sich die Flughunde auf Nahrungssuche. Sie ernähren sich hauptsächlich von Blättern, Pollen, Nektar oder Früchten (DeFrees und Wilson, 1988). Die Flughunde selbst gelten für den Menschen als proteinreiche Nahrung. Aus diesem Grund werden sie gejagt und auf afrikanischen Märkten als sogenanntes *bushmeat* zum Verkauf angeboten (DeFrees und Wilson, 1988; Drexler *et al.*, 2009).



Abb. 1.4: Eine Kolonie der Flughunde *Eidolon helvum* im Zoologischen Garten in Kumasi, Ghana (Westafrika). Modifiziert nach Drexler *et al.*, 2009.

Für die Gewinnung von Proben aus afrikanischen *E. helvum* Flughunden wurden Plastikfolien unter Bäumen im Zoologischen Garten in Kumasi (Ghana) ausgelegt, in denen eine große Flughundkolonie lebt. Hiermit wurden Ausscheidungen wie Kot und Urin der knapp 400.000 Tiere über fünf Tage lang aufgefangen und gesammelt, um diese anschließend zu analysieren (Drexler *et al.*, 2009). Weiterhin wurden Tiere einzeln mit Netzen eingefangen, um von diesen neben Ausscheidungen auch Speichel-, Blut- und Organproben zu entnehmen. Die Flughunde wurden zunächst mit dem Narkosemittel Ketamin eingeschläfert, um anschließend Mundhöhlenabstriche durchzuführen oder Blut- bzw. Organproben zu entnehmen. Zur Gewinnung viraler RNA wurden 100 mg der Ausscheidungen, 140 µl der Blut- oder Serumproben oder 30 mg der Gewebeproben verwendet. Letztere wurden unter Verwendung eines TissueLyser (Qiagen) homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation aus allen gesammelten Proben mittels RNeasy Kit (Qiagen) oder ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems). Die eluierte RNA (50-100 µl) wurde dann mit dem Superscript III OneStep RT-PCR Kit (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden Primer verwendet, die in den konservierten Regionen des Polymerase-Gens der Henipaviren binden. Dabei entstanden kleine cDNA-Fragmente mit einer Länge von 496 bp, welche mit der *Next Generation Sequencing* Methode (*Pyrosequencing*

454) analysiert wurden (Drexler *et al.*, 2012). Ein phylogenetischer Vergleich dieser Sequenzen mit der Familie der *Paramyxoviridae* zeigte eine hohe Übereinstimmung mit den Domänen I und II des Polymerase-Gens L (Drexler *et al.*, 2009). Durch diese Sequenzanalyse konnten dem phylogenetischen Stammbaum des Genus Henipavirus 19 neue Virusspezies zugeordnet werden (Drexler *et al.*, 2012).

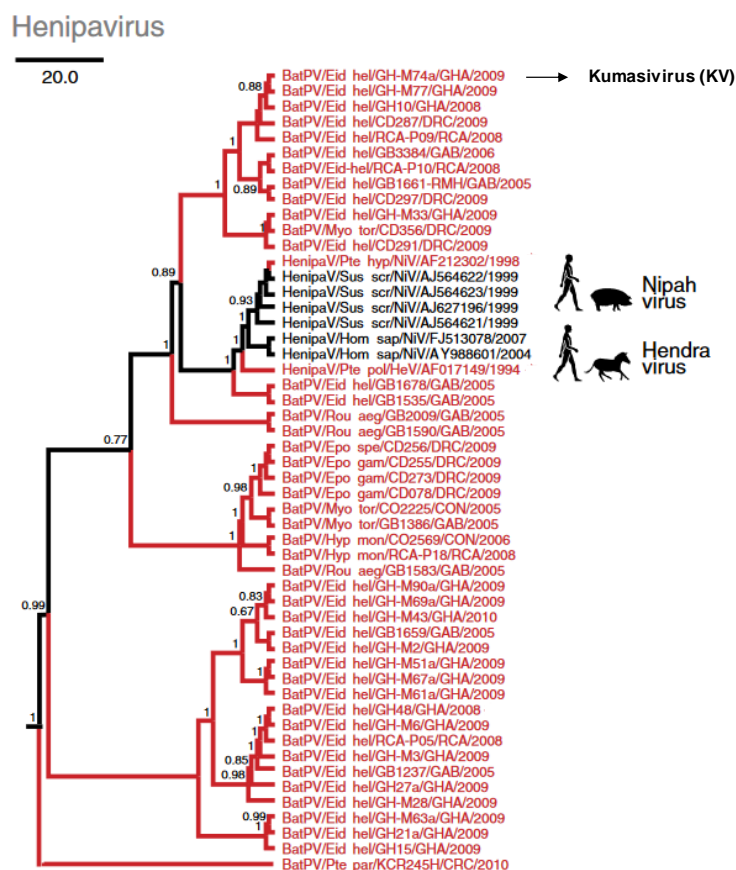


Abb. 1.5: Phylogenetischer Stammbaum der Henipaviren basierend auf der Sequenzanalyse der L-Gen-Fragmente. In schwarz sind alle bisher bekannten Henipaviren gezeigt, in rot sind alle Henipa-verwandten Viren dargestellt, die neu aus afrikanischen Flughunden isoliert werden konnten. Modifiziert nach Drexler *et al.*, 2012.

Abb. 1.5 zeigt den aktuellen phylogenetischen Stammbaum des Genus Henipavirus mit allen neu identifizierten afrikanischen Henipaviren. An oberster Stelle ist das Isolat BatPV/Eid_hel/GH-M74a/GHA/2009 zu finden, welches vor kurzem offiziell in Kumasivirus (KV) umbenannt wurde (Afonso *et al.*, 2016). Der Stammbaum zeigt, dass das KV sehr weit von den bisher bekannten Hendra- und Nipahviren (in schwarz

gekennzeichnet) entfernt ist. Jedoch ist es bis heute das einzige afrikanische Henipavirus, welches vollständig sequenziert und kloniert wurde.

Alle bisherigen Versuche, afrikanische Henipaviren direkt aus den Proben der Flughunde zu isolieren blieben ohne Erfolg. Weder auf Vero- oder CaCo2-Zellen, noch auf primären Zellen aus dem Darm, der Lunge oder Niere von verschiedenen Flughund-Arten wie *Myotis nattereri*, *Eidolon helvum* oder *Rousettus aegyptiacus* konnte ein zytopathischer Effekt beobachtet werden. Zudem konnte kein Viruswachstum mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Drexler *et al.*, 2009). Auf Grund dieser Tatsache können zur Zeit keine Infektionsstudien durchgeführt werden, um das pathogenetische Potenzial der afrikanischen Henipaviren einzuschätzen. Umso wichtiger ist es, die Funktion der Glykoproteine G und F, wie in dieser Arbeit vorgestellt, zu analysieren. Das bietet im Moment die einzige Möglichkeit, Aussagen über die Vermehrungsfähigkeit und den Wirtstropismus dieser Viren zu treffen.

1.6.3 Genomanalyse des Kumasivirus

Die RNA des KV wurde im Jahr 2009 aus der Milz eines Flughundes der Art *E. helvum* in Ghana isoliert. Dafür wurde die Milz zunächst homogenisiert und über einen Sucrose-Gradienten mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe eines RNeasy Kits (Qiagen). Für die Sequenzierung des gesamten Genoms wurden verschiedene Primerpaare generiert, um mehrere Genomstücke von bis zu 6 kb, sogenannte „*islet amplicons*“ zu generieren und diese im Anschluss mit Hilfe der „*primer walking*“-Methode zu sequenzieren. Die 5'- und 3'-Enden des Genoms wurden unter Verwendung des RACE-Verfahrens (*rapid amplification of cDNA ends*) bestimmt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Drosten). Die cDNA der Glykoproteine G und F wurde unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Die Gesamtlänge des KV Genoms beträgt 18.530 nt, was mit den Genomgrößen von HeV (18.234 bp) und NiV (18.246 bp) vergleichbar ist. Interessanterweise entspricht das KV-Genom jedoch nicht der für Henipaviren geltenden *rule of six*, was bedeutet, dass die Genomlänge eine durch sechs teilbare Zahl ist. Neben der vergleichbaren Genomlänge besitzt KV intergenische, nicht translatierte Bereiche, die ebenfalls denen von HeV und NiV in ihrer Länge entsprechen. Aufgrund dieser Homologien wurde KV dem Genus Henipavirus zugeordnet. Darüber hinaus weist KV weitere für Henipaviren charakteristische Eigenschaften auf: das putative Fusionsprotein besitzt neben einer

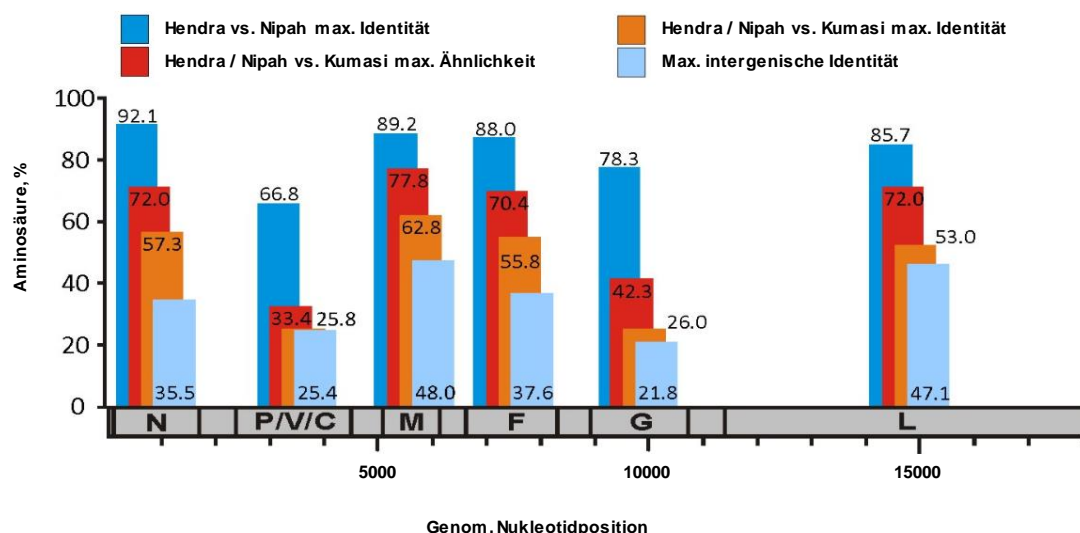


Abb. 1.6: Genomstruktur und Aminosäurevergleich der einzelnen Proteine zwischen Hendra-, Nipah- und Kumasivirus. Modifiziert nach Drexler *et al.*, 2012.

monobasischen Spaltstelle (PGNAR/FAG) auch ein Endozytose-Signal (YTPL) in der zytoplasmatischen Domäne (Drexler *et al.*, 2012).

In Abb. 1. 6 ist ein detaillierter Vergleich der Aminosäure-Ähnlichkeit der einzelnen Nipahvirus-, Hendravirus- und Kumasivirus-Proteine gezeigt. Die maximale Übereinstimmung zwischen hendraviralen und nipahviralen Proteinen ist in dunkelblau dargestellt. Die maximale Identität der Sequenzen beim Vergleich von Hendra-/Nipah mit Kumasivirus ist in orange abgebildet. Die Glykoproteine von HeV und NiV zeigen eine sehr hohe Identität in ihrer Sequenz: Diese liegt für das Fusionsprotein F bei 88 % und für das Glykoprotein G bei 78,3 %. Vergleicht man die Sequenz des KV mit den Sequenzen von HeV und NiV, so lassen sich größere Unterschiede feststellen. Während das KV-F Protein mit HeV-/NiV-F eine Identität von 55,8 % zeigt, beträgt diese für KV-G und HeV-/NiV-G lediglich 26 %. Nur an der Rezeptorbinde-Stelle ist eine Identität von 45 % zu finden (Pernet *et al.*, 2014). Die Ähnlichkeiten der Aminosäuren sind höher als die Identitäten, liegen aber auch nur bei 70,4 % für KV-F und bei 42,3 % für KV-G. Dieser Aminosäurevergleich lässt, wie schon der phylogenetische Stammbaum in Abb. 1.5 vermuten, dass das afrikanische KV nur entfernt mit den südostasiatischen und australischen Henipaviren verwandt ist.

1.7 Die Henipavirus Oberflächen-Glykoproteine G und F

1.7.1 Das Fusionsprotein F

Im Folgenden wird der strukturelle Aufbau des henipaviralen Fusionsproteins am Beispiel des NiV-F Proteins erläutert.

Insgesamt besteht das NiV-F Protein aus 546 AS und weist ein Molekulargewicht von 69 kDa auf (Harcourt *et al.*, 2000) (vgl. Abb. 1.7A). Wie alle paramyxoviralen Fusionsproteine zählt es zu den Typ-I-Transmembranproteinen (Wang *et al.*, 2001). Auf der Virushülle bzw. auf der Oberfläche infizierter Zellen liegt es in Form eines Homotrimers vor (Eaton *et al.*, 2004). Das Protein wird zunächst als inaktives Vorläuferprotein F_0 im Endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert und muss dann später in seine beiden Untereinheiten F_1 und F_2 proteolytisch gespalten werden, um biologisch aktiv zu werden. Die beiden Untereinheiten bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Das NiV-F Protein besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen drei in der F_2 -Untereinheit und zwei in der F_1 -Untereinheit sitzen. Vier dieser Stellen werden tatsächlich genutzt: beide Stellen in der F_2 -Untereinheit und zwei Stellen in der F_1 -Untereinheit (vgl. Abb. 1.7A). Beide N-Glykane in der F_1 -Untereinheit sind für die Spaltung und den Oberflächentransport unabdingbar (Moll *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die N-Glykane eine schützende Wirkung gegenüber neutralisierenden Antikörpern vermitteln (Aguilar *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu anderen systemisch replizierenden Viren findet die Spaltung des Vorläuferproteins F_0 an einer monobasischen Spaltstelle (Arginin an Position 109) statt. Diese Spaltung wird nicht, wie bei anderen Paramyxoviren durch eine Trypsin-ähnliche Protease veranlasst, sondern erst nach Endozytose durch die Wirtszell-Proteasen Cathepsin L und B vermittelt (Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2009; Diederich *et al.*, 2012). Essentiell für den intrazellulären Transportweg und die Spaltung des NiV-F Proteins ist die 28 Aminosäure (AS) lange zytoplasmatische Domäne am C-Terminus (Harcourt *et al.*, 2000; Vogt *et al.*, 2005; Weise *et al.*, 2010). Hier befindet sich ein klassisches Yxx ϕ Endozytose-Motiv in Form von YSRL (AS 525 – 528) (vgl. Abb. 1.7A). Dabei steht das Y für ein Tyrosin, x für eine beliebige Aminosäure und ϕ für eine Aminosäure mit hydrophoben Seitenketten, vorwiegend Leucin. Dieses veranlasst die Aufnahme des an der Oberfläche exprimierten Vorläuferproteins F_0 über Clathrin-haltige Vesikel in endosomale Kompartimente, in denen die Cathepsine das Protein in seine beiden Untereinheiten spalten können. Das gespaltene, nun fusionsaktive F-Protein wird zurück zur Oberfläche transportiert und kann Zell-Zell-Fusion vermitteln

oder in neu entstehende Viruspartikel eingebaut werden (Vogt *et al.*, 2005; Diederich *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2008). Durch die Cathepsin-abhängige proteolytische Aktivierung wird das Fusionspeptid (FP) am N-Terminus der F₁-Untereinheit freigelegt. Das FP ist eine innerhalb der Paramyxoviren hoch konservierte 20 AS lange hydrophobe Region und kann in die Membran der Zielzelle inserieren, um den Fusionsprozess, einzuleiten, was die Hauptaufgabe des F-Proteins darstellt (Epand, 2003). Dieser Vorgang ist nicht nur beim Viruseintritt in die Zelle, sondern auch später bei der Virusausbreitung über Zell-Zell-Fusion von wichtiger Bedeutung (Lamb und Kolakofsky, 2001). Dabei fusionieren infizierte Zellen mit nicht-infizierten, Rezeptor-tragenden Nachbarzellen zu mehrkernigen Riesenzellen, den sogenannten Synzytien (Bossart *et al.*, 2002; Tamin *et al.*, 2002). Für beide Prozesse ist eine Fusionshelferfunktion des G-Proteins nötig (Chang *et al.*, 2012; Plattet *et al.*, 2013; Jardetzky *et al.*, 2014). Nach der Bindung des G-Proteins an seinen zellulären Rezeptor kommt es zunächst zu einer Konformationsänderung im Glykoprotein, welche eine weitere Konformationsänderung im Fusionsprotein bewirkt (Lamb *et al.*, 2006). Dabei wird das FP umgelagert, sodass es an die Proteinoberfläche gelangt. Auf diese Weise kann es sich nun in die Membran der Zielzelle einlagern (vgl. Abb. 1.10C).

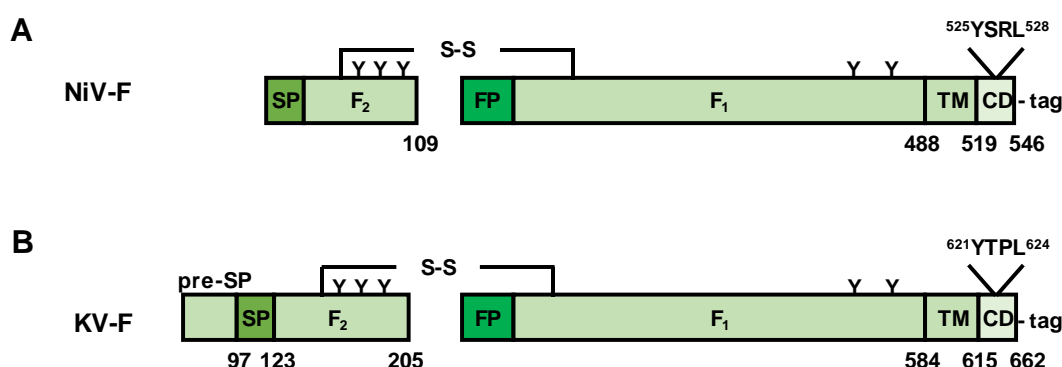


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des henipaviralen Fusionsproteins am Beispiel von NiV-F (A) und KV-F (B). SP = Signalpeptid, FP = Fusionspeptid, CD = zytoplasmatische Domäne, TM = Transmembrandomäne, Y = potentielle N-Glykosylierungsstellen, YSRL bzw. YTPL = Endozytosesignal. Nach Spaltung des Vorläuferproteins F₀ (nicht dargestellt) an Position 109 bei NiV-F bzw. 205 bei KV-F bleiben beide Untereinheiten F₂ und F₁ über eine Disulfidbrücke (S-S) miteinander verbunden. Am C-Terminus wurde jeweils ein HA- oder 2xFLAG-Epitop angefügt.

Ein Vergleich der NiV-F und KV-F Proteine zeigt, dass sich beide Fusionsproteine strukturell sehr stark ähneln. Die Aminosäuresequenz des KV-F Proteins ist lediglich um 115 AS größer, was hauptsächlich durch eine lange Sequenz vor dem Signalpeptid (SP), dem sogenannten pre-SP, verursacht wird (vgl. Abb. 1.7B).

1.7.2 Das Glykoprotein G

Das Glykoprotein G ist das zweite Oberflächenprotein der Henipaviren und hat ein Molekulargewicht von 78 kDa. Während NiV-G aus 602 Aminosäuren besteht, weist HeV-G eine Länge von 604 Aminosäuren auf (Wang *et al.*, 2001). Im Folgenden werden die charakteristischen Eigenschaften des Glykoproteins am Beispiel des NiV-G Proteins näher beschrieben:

Das G-Protein stellt ein klassisches Typ-II-Transmembranprotein mit einer 46 Aminosäuren langen N-terminalen zytoplasmatischen Domäne dar (Xu *et al.*, 2008). Auf diese folgt eine hydrophobe Transmembrandomäne, welche das Protein in der Virushülle oder in der Plasmamembran fest verankert. Extrazellulär liegt eine kurze Stielregion mit einer Länge von 106 Aminosäuren vor, gefolgt von einer großen globulären Kopfdomäne (AS 177 – 602) (vgl. Abb. 1.8 und 1.11A). Der strukturelle Aufbau des NiV-G gleicht der Struktur anderer paramyxoviraler, rezeptorbindender Proteine (Eaton *et al.*, 2006). Die große globuläre Kopfdomäne des NiV-G Proteins zeigt die Form eines sechsblättrigen β -Propellers. Jedes einzelne Propellerblatt besteht aus viersträngigen antiparallel verlaufenden β -Faltblättern (vgl. Abb. 1.8; Bowden *et al.*, 2008).

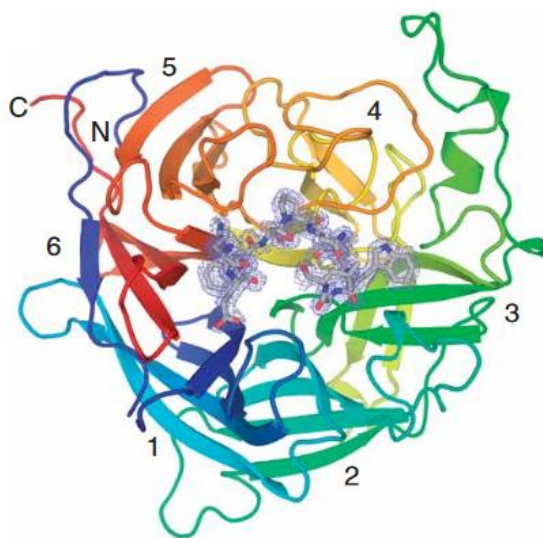


Abb. 1.8: Kristallstruktur der globulären Kopfdomäne des NiV-Glykoproteins. Aufsicht auf den sechsblättrigen β -Propeller in Interaktion mit Ephrin-B2 Aminosäureresten (blau-graue Struktur mittig). Der N-Terminus des G-Proteins ist in blau, der C-Terminus ist in rot dargestellt. Die Nummern geben die Ordnung der Blätter des β -Propellers an. Modifiziert nach Bowden *et al.*, 2008.

Oligomerisierung des NiV-G Proteins

Die Stiel-domäne des Glykoproteins ist für die Dimerisierung und höhere Oligomerisierung des Proteins von zentraler Bedeutung (Maar *et al.*, 2012). Das G-Protein liegt auf der Oberfläche als Dimer und Tetramer vor (Negrete *et al.*, 2007; Rockx *et al.*, 2012), welche über drei Cysteine (C146, C158 und C162) in der Stiel-domäne miteinander verbunden werden (Maar *et al.*, 2012) (vgl. Abb. 1.9). Die Entstehung der Oligomere folgt immer einer bestimmten Reihenfolge: zunächst bilden C158 und C162 eine intramolekulare Disulfidbrücke aus, um die vorliegenden reaktiven Thiole während der Proteinfaltung zu schützen (siehe Abb.1.9 links). Im weiteren Verlauf der Proteinfaltung isomerisiert diese Disulfidbrücke, sodass sehr wahrscheinlich eine doppelte Disulfidbrücke zwischen C158 und C162 zweier G-Monomere entsteht. Dieser Vorgang führt zur Entstehung von Dimeren (siehe Abb.1.9 Mitte). Anschließend können zwei Dimere über eine weitere Disulfidbrücke an Position C146 zu stabilen Tetrameren verbunden werden (siehe Abb.1.9 rechts). Die Ausbildung der letzten Disulfidbrücke ist abhängig von der vorherigen (doppelten) Disulfidbrückenbildung (Maar *et al.*, 2012). Neben den drei Cysteinen in der Stiel-domäne gibt es noch weitere 14 Cysteine in der globulären Kopfdomäne. Diese sind für die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken verantwortlich, welche wiederum für die korrekte Faltung des Proteins notwendig sind (Xu *et al.*, 2008).

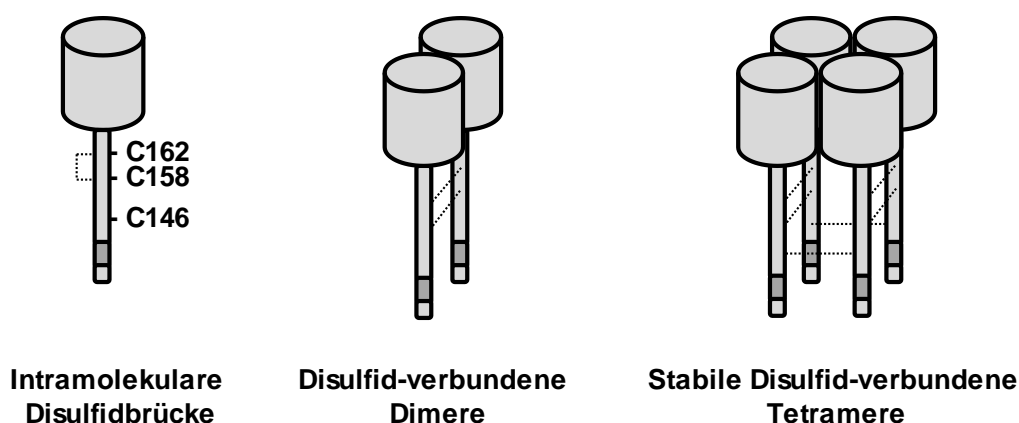


Abb. 1.9: Modell der Oligomerisierung des NiV-G Proteins. Zwischen den Cysteinresten an den Aminosäurepositionen 158 und 162 wird im G-Monomer eine intramolekulare Disulfidbrücke ausgebildet (links). Für die Bildung von Dimeren wird diese aufgelöst, sodass zwei intermolekulare Disulfidbrücken gebildet werden können (Mitte). Zur Ausbildung von stabilen Tetrameren wird über das Cystein an Position 146 eine weitere Disulfidbrücke ausgebildet, wodurch zwei Dimere kovalent miteinander verbunden werden (rechts). Modifiziert nach Maar *et al.*, 2012.

N-Glykosylierung der NiV-/HeV-G Proteine

Im NiV-G Protein befinden sich sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen zwei in der Stieldomäne (G1 und G2) und fünf in der globulären Kopfdomäne (G3 – G7) liegen (Biering *et al.*, 2012) (vgl. Abb. 1.11A). Diese fünf Stellen sind innerhalb der Henipaviren konserviert und liegen auch im HeV-G vor (Bradel-Tretheway *et al.*, 2015). Sechs dieser N-Glykosylierungsstellen (G2 – G7) werden tatsächlich verwendet. Zusätzlich gibt es noch vier potentielle O-Glykosylierungsstellen in der Stieldomäne (Biering *et al.*, 2012).

Endozytose des NiV-G Proteins

In der zytoplasmatischen Domäne befinden sich sowohl ein Dityrosin- als auch ein Dileucin-Motiv (AS Positionen 28/29 bzw. 41/42), welche Homologien zu klassischen Endozytose-Motiven aufweisen. Jedoch konnten frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass das NiV-G Protein nicht aktiv, sondern lediglich passiv während des normalen Umsatzes der Plasmamembran (*turnover*) internalisiert wird (Vogt *et al.*, 2005).

Rezeptorbindung

Eine der beiden wichtigen Funktionen der globulären Ektodomäne ist die spezifische Erkennung und Bindung der NiV-Rezeptoren Ephrin-B2/-B3 auf der Wirtszelle (Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005; Details zu den NiV-Rezeptoren siehe Kap. 1.8). Anders als die Rezeptor-bindenden Proteine anderer Paramyxoviren, wie beispielsweise das Hämagglutinin (H) der Morbilliviren oder die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) der Rubulaviren, hat das Henipavirus-G Protein weder eine hämagglutinierende noch eine Neuraminidase-Aktivität (Wang *et al.*, 2001). Guillaume und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass die für die Rezeptorbindung wichtigen Aminosäuren am C-terminalen Ende der Kopfdomäne liegen (Guillaume *et al.*, 2006). In neueren Studien gelang es, die für die Rezeptorbindung essentiellen Aminosäuren im Bereich von AS 498 - 602 zu identifizieren (Lam *et al.*, 2017).

Fusionshelferfunktion

Nach der Rezeptorbindung vermittelt die globuläre Ektodomäne des G-Proteins die sogenannte Fusionshelferfunktion (Chang *et al.*, 2012; Plattet *et al.*, 2013; Jardetzky *et al.*, 2014). Hierbei geht das G-Protein nach der Rezeptorbindung eine Konformationsänderung ein, welche wiederum eine Konformationsänderung im NiV-F Protein bewirkt, sodass Virus-Zell- oder Zell-Zell-Fusion eingeleitet werden kann

(Bossart *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008; Jardetzky *et al.*, 2014). Ein Modell nach Stone

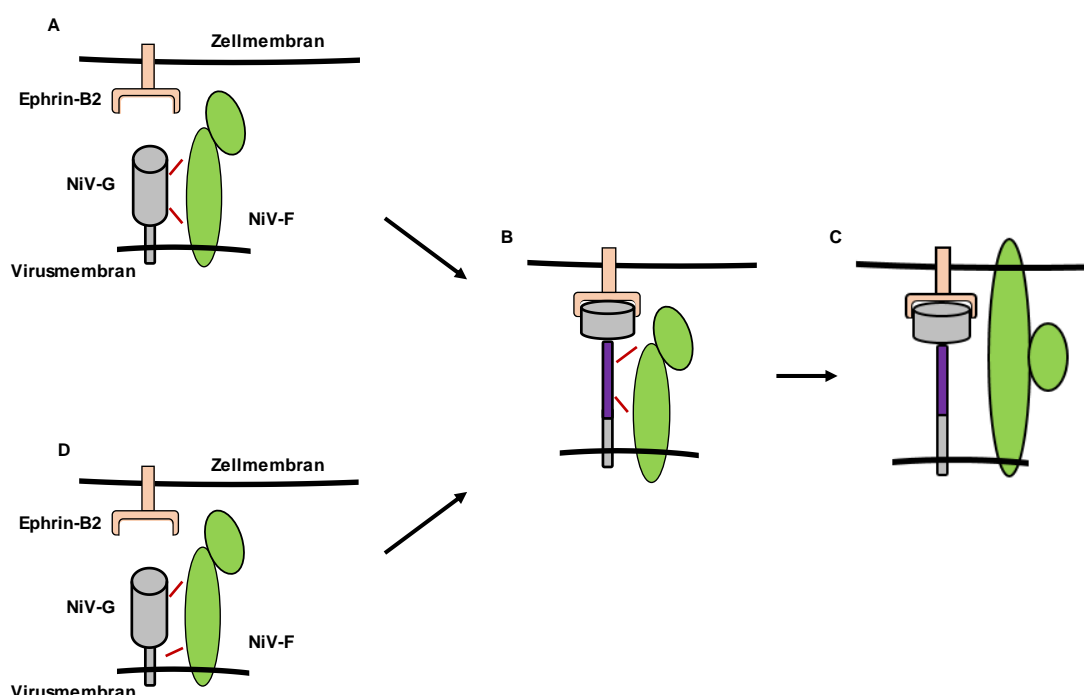


Abb. 1.10: Modell der G- und F-Interaktion zur Einleitung der Virus-Zell-Fusion. (A) Vor der Bindung des G-Proteins an Ephrin-B2 interagieren NiV-G und NiV-F über die globuläre Kopfdomäne des G-Proteins miteinander. Die Kopfdomäne des G-Proteins verdeckt den größten Teil der C-terminalen Stiel-domäne. (B) Nach der Rezeptorbindung durchläuft das G-Protein eine Konformationsänderung in der Kopfdomäne, sodass die Stiel-domäne freigelegt wird (violetter Bereich). Die Interaktion mit F wird nun über diesen Bereich der Stiel-domäne vermittelt. (C) Die Interaktion zwischen G und F führt zu einer Konformationsänderung im F-Protein, sodass sich dieses über das Fusionspeptid in der Zellmembran einlagert. (D) Eine alternative Hypothese: Vor der Rezeptorbindung wird die Interaktion zwischen G und F sowohl über die Kopfdomäne als auch den N-terminalen Bereich der Stiel-domäne vermittelt.

Protein-Protein-Interaktionen werden als rote Striche dargestellt.

Zur vereinfachten Darstellung sind alle Proteine als Monomer abgebildet. Modifiziert nach Stone *et al.*, 2016

(2016) schlägt hierfür folgende Schritte vor:

In der Virusmembran liegen G- und F-Proteine dicht nebeneinander vor und interagieren über den globulären Kopf des G-Proteins miteinander (vgl. Abb. 1.10A). Bindet das G-Protein an seinen zellulären Rezeptor (Ephrin-B2 oder -B3), so führt dies zunächst zu einer Konformationsänderung in der Nähe der Rezeptor-Bindestelle und anschließend zu einer Veränderung in der N-terminalen Region im globulären Kopf des G-Proteins. Als Folge dessen wird der C-terminale Bereich der Stiel-domäne freigelegt, welcher über eine F-induzierende Wirkung verfügt (sogenanntes *F-triggering*) (vgl.

Abb. 1.10B). Das Fusionsprotein, welches sich im nächsten Schritt vom G-Protein löst, durchläuft nun ebenfalls eine Konformationsänderung, sodass das Fusionspeptid in die Zellmembran eingelagert und die Virus-Zell-Fusion eingeleitet werden kann (vgl. Abb. 1.10C). Neben der Annahme, dass G- und F-Proteine vor der Rezeptorbindung über die Kopfdomäne des G-Proteins miteinander interagieren, besteht auch die Möglichkeit, dass schon zu Beginn sowohl die Kopf- als auch die Stieldomäne die Interaktion zwischen beiden Proteinen vermitteln (vgl. Abb. 1.10D).

Vergleich zwischen KV-G und NiV-G

Ein Vergleich zwischen NiV-G und KV-G zeigt, dass sich beide Proteine strukturell stark ähneln (vgl. Abb. 1.11A und B). Jedoch ist das KV-G Protein um 30 AS länger, was hauptsächlich auf eine verlängerte zytoplasmatische Domäne zurückzuführen ist (46 AS bei NiV-G bzw. 62 AS bei KV-G). Folglich ist das Molekulargewicht auch leicht erhöht, es liegt für KV-G bei 85 kDa, während es bei NiV-G nur bei 78 kDa liegt. Ein weiterer Unterschied ist die höhere Anzahl an potentiellen N-Glykosylierungsstellen: neun im KV-G im Vergleich zu sieben im NiV-G bzw. acht im HeV-G Protein. Dabei liegen jedoch wie bei NiV-G und HeV-G auch zwei Stellen in der Stieldomäne, die restlichen sieben befinden sich in der globulären Kopfdomäne. Übereinstimmend für NiV-G und KV-G ist die Anzahl der Cysteine in der Stieldomäne, hier gibt es jeweils 3 Cysteine. Im Gegensatz dazu liegen jedoch noch drei nicht konservierte Cysteine in der globulären Kopfdomäne des KV-G-Proteins. Ein weiterer Unterschied ist das zusätzliche Endozytose-Motiv YFGL in der zytoplasmatischen Domäne des KV-G Proteins.

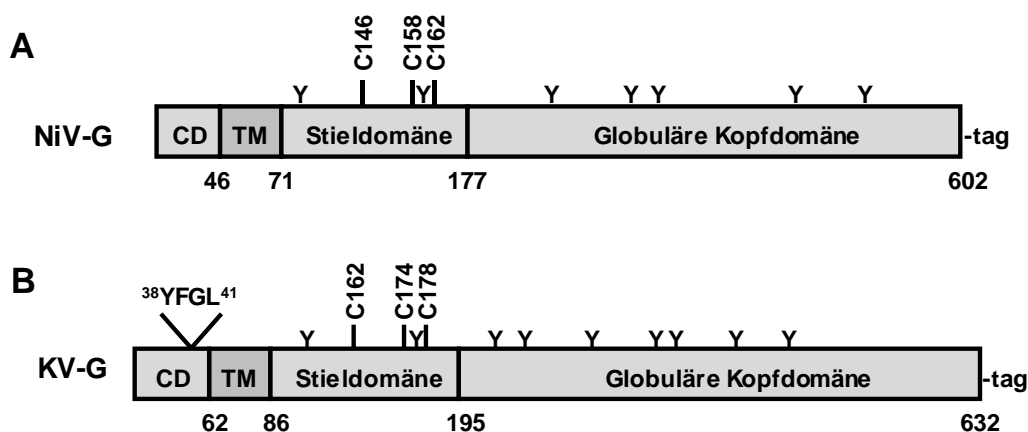


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der henipaviralen Glykoproteine am Beispiel von NiV-G (A) und KV-G (B). CD = zytoplasmatische Domäne, TM = Transmembrandomäne (Länge der TM des KV-G wurde durch das Online-Programm http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html bestimmt); Y = potentielle N-Glykosylierungsstellen; Cysteine in der Stiel-domäne sind durch vertikale Balken gekennzeichnet, am C-Terminus wurde jeweils ein HA- oder 2xFLAG-Epitop angefügt.

1.7.3 Die Rolle der henipaviralen Glykoproteine im Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Henipaviren beginnt mit der spezifischen Bindung des G-Proteins an den Rezeptor Ephrin-B2/-B3 auf der Zelloberfläche (vgl. Abb. 1.12). Nach der Bindung an den Rezeptor führt das G-Protein zunächst seine Fusionshelferfunktion aus und induziert damit eine Konformationsänderung im F-Protein, sodass dieses das hydrophobe Fusionspeptid am N-Terminus der F₁-Untereinheit in die Zielmembran integrieren kann (Lamb *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2016). Anschließend erfolgt die pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran und das Nukleokapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt (Tamin *et al.*, 2002). Hier finden im weiteren Verlauf alle essentiellen Schritte der viralen Transkription und Replikation statt. Während die Synthese der Proteine M, N, P und L im Zytoplasma erfolgt, werden die Glykoproteine G und F an Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert und anschließend über den anterograden Transport über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Dabei werden beide Proteine glykosyliert. Das F-Protein, welches in seiner inaktiven, nicht gespaltenen Form an die Oberfläche gelangt, wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose in endosomale Kompartimente internalisiert und dort durch die wirtszelleigenen Cysteinproteasen Cathepsin B und L gespalten. Anschließend gelangt es in seiner aktiven Form über *recycling* Endosomen zurück an die Plasmamembran (Diederich *et al.*, 2005; Pager und Dutch, 2005; Vogt *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2012). Dort kann es zusammen mit dem G-Protein

in neu entstandene Virionen eingebaut werden oder Zell-Zell-Fusion für die

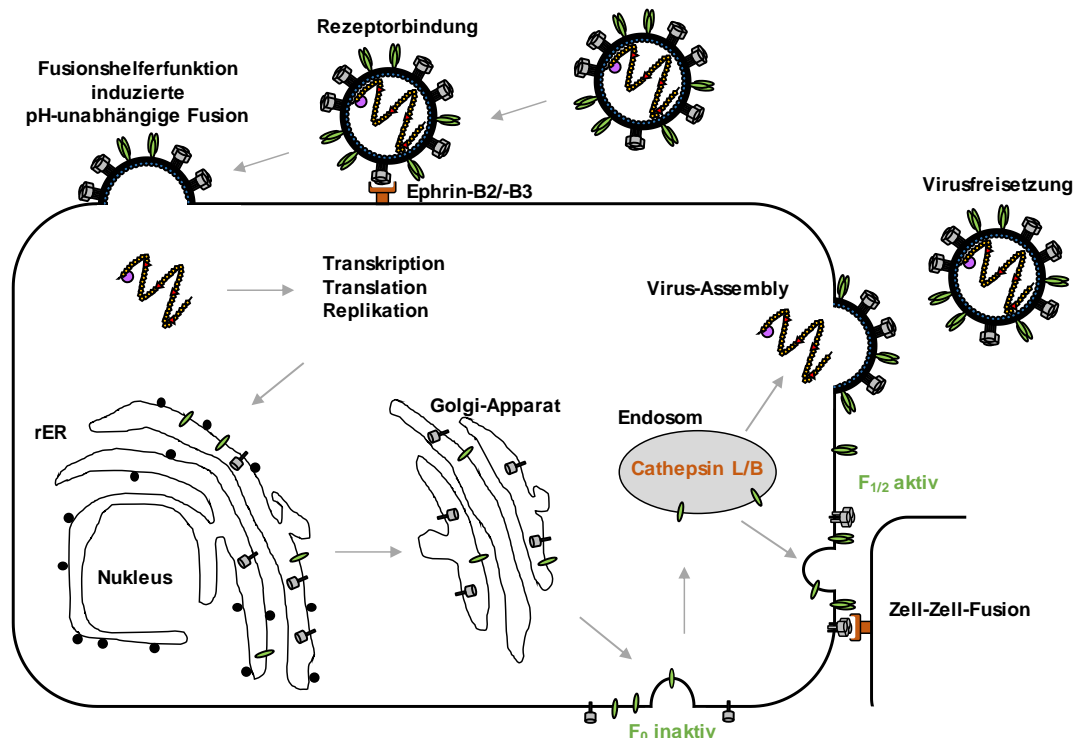


Abb. 1.12: Schematische Darstellung des henipaviralen Replikationszyklus, mit Fokus auf die Rolle der G- und F-Proteine. rER = raues Endoplasmatisches Retikulum

Virusausbreitung vermitteln.

1.8 Die Henipavirus-Rezeptoren Ephrin-B2 und -B3

Da Henipaviren ein konserviertes und ubiquitär exprimiertes Protein als Rezeptor benutzen, können sie viele verschiedene Zelltypen und viele Säugetierspezies infizieren. Im Jahr 2005 gelang es zwei Arbeitsgruppen, den Liganden Ephrin-B2 als Henipavirus-Rezeptor zu identifizieren (Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005). Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass Ephrin-B3 ebenso als NiV-Rezeptor fungieren kann. Die Affinität von NiV-G zu Ephrin-B3 ist jedoch geringer als zu Ephrin-B2 (Negrete *et al.*, 2006). In Regionen des Gehirns, wie beispielsweise dem *Cerebralen Cortex* oder *Hippocampus*, in denen sowohl Ephrin-B2 als auch Ephrin-B3 exprimiert werden, können beide Proteine als henipaviraler Rezeptor tätig sein. Obwohl Ephrin-B2 ubiquitär exprimiert wird, gibt es auch Regionen im Stammhirn, wie das *Corpus Callosum*, oder das Rückenmark, in denen das Protein nicht nachgewiesen

werden kann. Hier dient dann Ephrin-B3 wahrscheinlich ausschließlich als Rezeptor (Negrete *et al.*, 2006 und 2007).

Ephrin-B2 und -B3 zählen zu den Typ-I-Transmembranproteinen und fungieren als Liganden für Ephrin-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Review Pernet und Lee, 2012). Bei Interaktion des jeweiligen Liganden-Rezeptor-Paares kommt es zu einem sogenannten *bidirectional signalling*. Diese Signalkaskade ist bei vielen verschiedenen Prozessen, wie beispielsweise der Entwicklung des Nervensystems oder der Angiogenese, wichtig. Zudem übernehmen Ephrin-B2 Liganden essentielle Funktionen in der kardiovaskulären Entwicklung (Kullander und Klein, 2002; Poliakov *et al.*, 2004; Attwood *et al.*, 2012). Da diese Entwicklungsprozesse bei fast allen Säugern stattfinden, sind Ephrin-Liganden und ihre Rezeptoren nicht nur ubiquitär exprimiert, sondern sowohl in ihrer DNA- als auch Aminosäure-Sequenz hoch konserviert (Bowden *et al.*, 2008; vgl. Tab.1.1).

Wie man in Tab. 1.1 erkennen kann, ist die Aminosäuresequenz der Ephrine-B2 und -B3 von Flughunden und anderen Säugetieren sowohl in ihrer DNA- als auch Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Diese Tatsache macht es unter anderem möglich, dass sich Viren, die Flughunde als ihren natürlichen Wirt nutzen, auch in anderen Säugetieren effizient replizieren können.

Tab. 1.1: Vergleich der Aminosäuren- und DNA-Sequenzen von Ephrin-B2 und -B3 in verschiedenen Säugetierspezies. Der Vergleich bezieht sich auf die humanen Sequenzen, alle Angaben in Prozent. Modifiziert nach Bossart *et al.*, 2007.

	Ephrin-B2		Ephrin-B3	
	DNA	Aminosäure	DNA	Aminosäure
Mensch	100	100	100	100
Pferd	95	96	95	98
Schwein	95	96	95	97
Katze	94	96	93	97
Hunde	93	96	95	97
<i>Pteropus alecto</i>	94	95	94	97
<i>Pteropus vampyrus</i>	94	95	94	97
Maus	91	96	91	95

1.9 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Während Ausbrüche der hochpathogenen Nipah- und Hendraviren auf den südostasiatischen Raum sowie Australien begrenzt sind, gibt es in den letzten Jahren immer mehr Hinweise darauf, dass die geographische Verbreitung von Henipa-ähnlichen Viren weitaus größer ist. Da es bisher jedoch nicht möglich war, vermehrungsfähige Viren aus Flughunden zu isolieren, ist es zur Zeit nicht möglich, das pathogenetische Potential dieser Viren mittels Infektionsstudien zu analysieren. Um der Frage nachzugehen, ob und inwieweit diese Viren in der Lage sind, andere Säuger, wie z. B. Nutztiere oder den Menschen, zu infizieren, sollte die Funktionalität der Oberflächen-Glykoproteine G und F am Beispiel des Prototypen Kumasivirus (KV) detailliert untersucht werden. Die Oberflächenproteine von Henipaviren spielen sowohl für die erfolgreiche Infektion als auch die Virusausbreitung eine bedeutende Rolle, da sie neben der Rezeptorbindung auch den Viruseintritt in die Zelle und die Zell-Zell-Fusion vermitteln. Wir und auch andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass die Koexpression der KV-G und -F Proteine in Henipavirus permissiven Zelllinien nicht zur Henipavirus-charakteristischen Zell-Zell-Fusion führt, was hauptsächlich auf ein fusionsdefektes KV-F Protein zurückzuführen ist (Krüger *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2014; Pernet *et al.*, 2014; Weis, Behner *et al.*, 2014). Ein heterotypischer Fusionsassay des KV-G mit NiV-F führte zu einer limitierten Synzytienbildung, was darauf hinweist, dass das KV-G Protein generell funktionsfähig ist (Weis, Behner *et al.*, 2014). In dieser Arbeit sollte nun das KV-G Protein auf molekularer Ebene im Vergleich zum NiV-G Protein charakterisiert werden, um die Ursachen für die limitierte Fusionshelferfunktion zu identifizieren. Trotz struktureller Ähnlichkeiten zwischen NiV-G und KV-G, zeigen beide eine Sequenzidentität von lediglich 26 % auf (Drexler *et al.*, 2012). KV-G besitzt zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstellen, sowie nicht konservierte Cysteine in der globulären Kopfdomäne und ein nicht konserviertes Endozytosesignal in der zytoplasmatischen Domäne. Um zu klären, inwieweit diese Sequenzunterschiede einen Einfluss auf die Proteinexpression, den Oberflächentransport, die Oligomerisierung und die Fusionshelferfunktion des Proteins haben, sollten verschiedene Mutationen in diesen Bereichen einzeln und in Kombination eingefügt werden. Die Gesamt- und Oberflächenexpression sollte dann mittels Western Blot, Oberflächenbiotinylierung, metabolischer Markierung oder quantitativer FACS-Analyse ermittelt werden. Zur Analyse der Fusionshelferfunktion der Mutanten sollten jeweils heterotypische Fusionsassays mit dem NiV-F Protein durchgeführt werden.

Diese funktionelle Charakterisierung des KV-G Proteins im direkten Vergleich zum G-Protein des hochpathogenen NiV soll letztendlich helfen einzuschätzen, wie groß das

Potential neuer afrikanischer Henipaviren ist, die Speziesbarriere zu überwinden und Infektionen in Nutztieren oder Menschen zu verursachen.

II Ergebnisse

2.1 Untersuchung der Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins

Zellen, die den Henipavirus Rezeptor Ephrin-B2 oder Ephrin-B3 auf der Zelloberfläche exprimieren und mit den beiden henipaviralen Glykoproteinen F und G kotransfiziert werden, bilden mehrkernige Riesenzellen, sogenannte Synzytien, aus. Weitere virale Faktoren werden hierfür nicht benötigt, sodass sich die biologische Aktivität von henipaviralen Glykoproteinen in einem Fusionsassay leicht untersuchen lässt. Die Funktion der Henipavirus-Glykoproteine, Zell-Zell-Fusion zu induzieren ist von großer Bedeutung, da sich auf diese Weise das Virus im Zellverband ausbreiten kann, ohne dass Viren freigesetzt und neue Zellen infiziert werden müssen. Dabei hängt die Bildung der Synzytien ausschließlich von der Rezeptorbindung und der Fusionshelferfunktion des G-Proteins sowie der Fusionsaktivität des F-Proteins ab.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass die Koexpression der beiden KV Glykoproteine G und F nicht zu Synzytienbildung führt (vgl. Abb. 2.1 links), was hauptsächlich auf ein fusionsdefektes KV-F Protein zurückzuführen ist (Weis, Behner *et al.*, 2014). Um jedoch die biologische Aktivität des KV-G Proteins trotzdem analysieren zu können, wurde ein heterotypischer Fusionsassay (siehe Kap. 5.2.7) durchgeführt, bei dem das KV-G Protein zusammen mit dem funktionellen NiV-F Protein in Vero76-Zellen exprimiert wurde.

Für diesen Assay wurden Vero76-Zellen auf 6-well Platten ausgesät (siehe Kap. 5.2.4) und mit Plasmiden, die für KV-G und KV-F oder NiV-G und NiV-F oder KV-G und NiV-F kodieren, jeweils im Verhältnis 1:1 mittels LFA2000 transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). 48 h nach der Transfektion (*post transfection*, p.t.) wurden die Zellen mit einer Giemsa-Lösung inkubiert, um die Zellkerne zu färben und die Synzytien besser detektieren zu können (siehe Kap. 5.2.7). Zur Quantifizierung der Fusionshelferaktivität wurden 50 Blickfelder von jedem 6-well ausgezählt und die mittlere Kernanzahl pro Synzytium bestimmt.

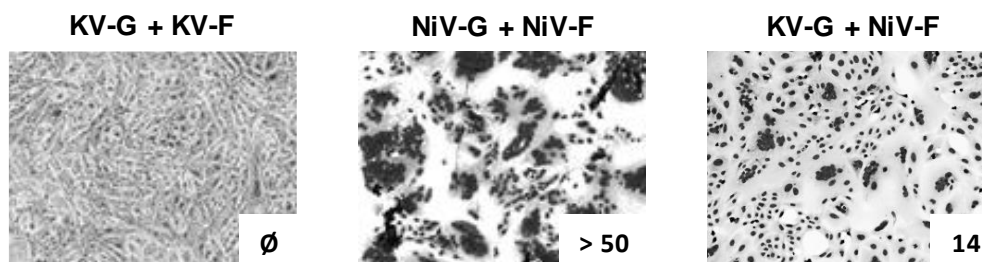


Abb. 2.1: Nachweis der Synzytienbildung in NiV- und KV-Glykoprotein transfizierten Vero76-Zellen. Auf 6-wells ausgesäte Vero76-Zellen wurden mit pCG-KV-G und pCAGGS-KV-F oder pCG-NiV-G und pCAGGS-NiV-F oder pCG-KV-G und pCAGGS-NiV-F jeweils im Verhältnis von 1:1 (2,5 µg G + 2,5 µg F) mittels LFA2000 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellkerne wurden mittels Giemsa (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. Zur Quantifizierung der Synzytiengröße wurden von jeder Probe 50 Blickfelder ausgezählt und der Mittelwert der Zellkerne pro Synzytium bestimmt. Die Zahl am unteren rechten Bildrand gibt die durchschnittliche Anzahl der Kerne pro Synzytium an.

Die Koexpression von NiV-F und NiV-G führt zu einer deutlichen Zell-Zell-Fusion (Abb. 2.1 Mitte). Hier zeigen die Synzytien eine durchschnittliche Größe von über 50 Zellkernen. Im Gegensatz dazu zeigt die heterotypische Koexpression von NiV-F und KV-G Proteinen nur kleine Synzytien mit einer durchschnittlichen Größe von 14 Kernen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Fusionshelferfunktion (*fusion-helper function*) des KV-G Proteins im Vergleich zu der des NiV-G Proteins bedeutend reduziert ist.

Bossart und Kollegen (2002) konnten bereits zeigen, dass eine heterotypische Koexpression der Glykoproteine von NiV und HeV zur Synzytienbildung führt. Dabei entsprach die Größe der Synzytien, welche durch die Koexpression von HeV-G und NiV-F induziert wurden, der Synzytiengröße von HeV-G und HeV-F (Bossart *et al.*, 2002). Daraus lässt sich schließen, dass die Zell-Zell-Fusion bei einer heterotypischen Koexpression von zwei voll funktionellen Henipavirus Glykoproteinen nicht eingeschränkt ist. Diese Beobachtung verdeutlicht die geringe Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins im Vergleich zu NiV-G.

2.2 Untersuchung der Oberflächenexpression des KV-G Proteins

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das KV-G Protein im Vergleich zu NiV-G eine reduzierte Fusionshelferfunktion besitzt, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wodurch die Aktivität des Proteins beeinträchtigt wird.

Da wir bereits zeigen konnten, dass das KV-G Protein genau wie NiV-G das zelluläre Oberflächenprotein Ephrin-B2 als Rezeptor verwendet (Weis, Behner *et al.*, 2014), sollte nun die Oberflächenexpression mittels Oberflächenbiotinylierung (siehe Kap. 5.3.3) untersucht werden. Hierfür wurden Vero76-Zellen auf 6-wells mit Plasmiden, die entweder für NiV-G oder KV-G kodieren, transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). Nach 24 h erfolgte die unspezifische Markierung aller Oberflächenproteine mit EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit einem Triton X-100 haltigen Puffer lysiert und die markierten Oberflächenproteine mit NeutrAvidin-Beads über Nacht aus dem Zelllysats präzipitiert. Am Folgetag wurde sowohl der Überstand, welcher die nicht biotinylierten (d. h. intrazellulären) Proteine enthielt, als auch die NeutrAvidin-Beads, an welche die biotinylierten Oberflächenproteine gebunden waren, mit 2x SDS-Probenpuffer (PP) versetzt. Nach dem Aufkochen konnten die Proben mittels 10 %iger SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran (NC) übertragen werden (siehe Kap. 5.3.6 und 5.3.7). Die Proteine konnten über den angefügten HA-Tag spezifisch mit einem Primärantikörper (aus Maus) markiert und über einen IRDye800-fluoreszierenden Zweitantikörper (aus Esel) detektiert werden (siehe Kap. 5.3.8). Ein direkter Vergleich der intrazellulären Proteinexpression und der Oberflächenexpression ermöglicht es, Aussagen über die Effizienz des Oberflächentransports der beiden

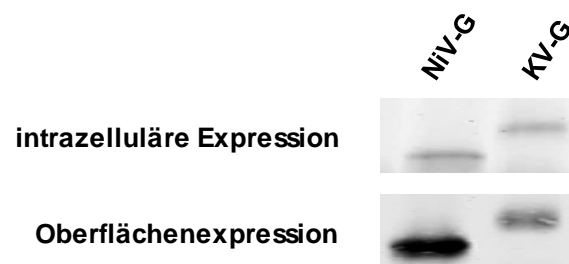


Abb. 2.2: Nachweis und Vergleich der intrazellulären Expression und der Oberflächenexpression der NiV-G und KV-G Proteine. Auf 6-well ausgesäte Vero76-Zellen wurden mit jeweils 5 µg pCG-NiV-G oder pCG-KV-G mittels LFA2000 transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die Oberflächenbiotinylierung durch EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin und anschließend eine Zellyse durch Triton X-100 Lysepuffer, bevor die biotinylierten Oberflächenproteine mit NeutrAvidin-Beads präzipitiert wurden. Die Auftrennung der biotinylierten Proteine (100 % der Gesamtprobe) und nicht biotinylierten (d. h. intrazellulären) Proteine (2 % der Gesamtprobe) erfolgte mittels 10 %iger SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Mit Hilfe des *Semi-Dry Blot* Verfahrens wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Primärantikörpern (1:1000; aus Maus) gegen den HA-tag der Proteine und IRDye800-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000; aus Esel) sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LI-COR).

Glykoproteine zu treffen.

Vergleicht man die intrazelluläre Expression von NiV-G und KV-G miteinander (Abb. 2.2 oberer Teil), so erkennt man deutlich, dass die Expressionslevel beider Proteine ähnlich sind. Im Gegensatz dazu ist ein deutlicher Unterschied bei der Zelloberflächenexpression (unterer Teil) zu erkennen. Während KV-G auf der Oberfläche nur schwach nachweisbar ist, wird NiV-G sehr stark exprimiert. Die geringere Oberflächenexpression von KV-G bei vergleichbarer intrazellulärer Expression mit NiV-G lässt auf einen ineffizienten Transport des KV-G Proteins an die Zelloberfläche schließen. Die verschiedenen Laufhöhen der NiV- und KV-G Proteine lassen sich auf die unterschiedlich langen Aminosäuresequenzen und damit verbundenen Molekulargewichte von NiV-G und KV-G zurückführen (602 bp und 78 kDa bei NiV-G sowie 632 bp und 85 kDa bei KV-G).

Zur weiteren quantitativen Analyse wurde die Gesamt- und die Oberflächenexpression des KV-G Proteins im Vergleich zum NiV-G Protein mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse; siehe Kap. 5.3.11) bestimmt. Hierfür wurden auf 6-well ausgesäte Vero76-Zellen (siehe Kap. 5.2.4) mit Plasmiden, die entweder für NiV-G oder KV-G kodieren, mit LFA2000 transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). Nach 24 h wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und in Suspension mit 0,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Sollte die Gesamtexpression gemessen werden, so erfolgte anschließend die Permeabilisierung der Zellen mittels 0,2 % Saponin in FACS-Puffer (PBS_{def}/1 % BSA). Da der Vorgang der Permeabilisierung durch Saponin reversibel ist, erfolgten auch alle weiteren Wasch- und Antikörper-Inkubationsschritte mit Saponin-haltigem FACS-Puffer. Nach der Fixierung +/- Permeabilisierung wurden die G Proteine mit anti-HA Antikörpern (aus Maus) und einem gegen Maus gerichteten FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines *Guava EasyCyte Mini Systems* (Guava Technologies), wobei in jedem Ansatz 5.000 Zellen analysiert wurden.

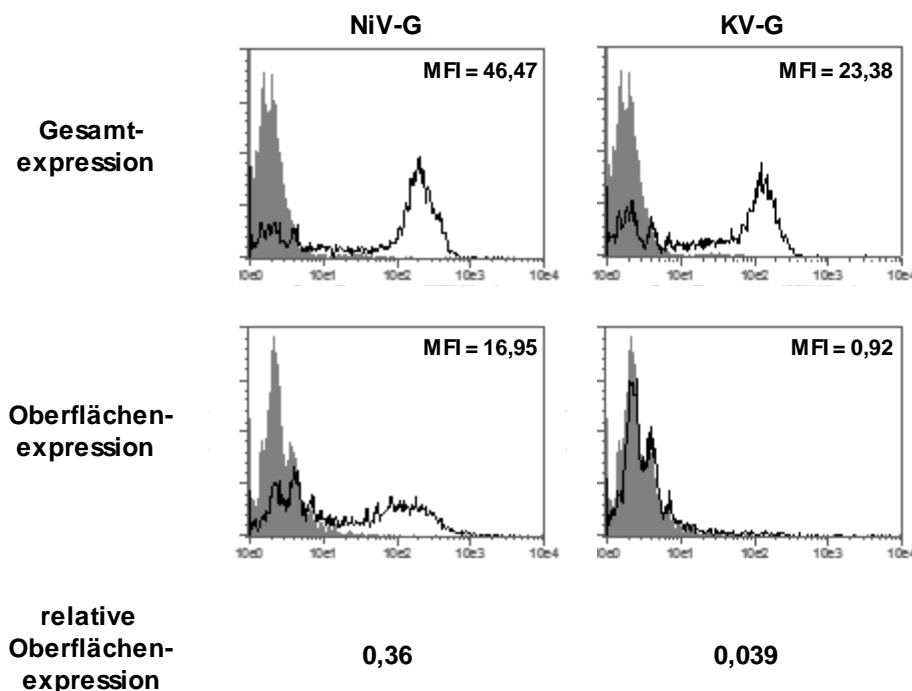


Abb. 2.3: Quantitativer Nachweis der Gesamtexpression und Oberflächenexpression der NiV-G und KV-G Proteine in Vero76-Zellen (FACS-Analyse). Mit 5 µg pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mittels Accutase abgelöst, bevor sie mit 0,5 % PFA fixiert (Oberflächenfärbung) oder zusätzlich mit 0,2 % Saponin (Gesamtfärbung) permeabilisiert wurden. Die Zellen wurden dann mit anti-HA Antikörper (1:500; aus Maus) inkubiert und anschließend mit einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200; aus Ziege) gefärbt. Die grauen Kurven stellen die unspezifische Hintergrundfärbung dar (Färbung von Zellen, die mit 5 µg Leervektor transfiziert wurden). Am *Guava EasyCyte Mini System* wurden pro Probe 5.000 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Cytosoft 4.2* (Guava Technologies). MFI = *mean fluorescence intensity*

Die Daten der quantitativen Durchflusszytometrie stützen die in der Oberflächenbiotinylierung (Abb. 2.2) gewonnenen Ergebnisse. Während die Gesamtexpression beider Proteine gut nachweisbar ist (obere Reihe, Gesamtexpression), ist KV-G auf der Oberfläche kaum zu detektieren (untere Reihe, Oberflächenexpression). Für NiV-G zeigt die Oberflächenfärbung jedoch eine spezifische Population. Zur Bestimmung der relativen Oberflächenexpression beider Proteine wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensities*, MFI) von Oberflächen- und Gesamtexpression miteinander verrechnet, indem die MFI-Werte der Oberfläche (für NiV-G 16,95 und KV-G 0,92) auf die MFI-Werte der Gesamtexpression (für NiV-G 46,47 und KV-G 23,38) bezogen wurden. Dabei wird deutlich, dass die relative Oberflächenexpression des KV-G Proteins (0,039) im Vergleich zum NiV-G Protein (0,36) 10-fach reduziert ist. Dieses Ergebnis bestärkt die aufgestellte Hypothese, dass das KV-G Protein ineffizient an die Oberfläche transportiert wird.

2.3 Intrazelluläre Lokalisation des KV-G Proteins

Die Beobachtung, dass die Oberflächenexpression, jedoch nicht die Gesamtexpression von KV-G im Vergleich zu NiV-G deutlich reduziert ist, lässt auf einen Transportdefekt des KV-G Proteins schließen. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurden intrazelluläre Lokalisationsstudien beider Proteine mittels Immunfluoreszenzanalyse (siehe Kap. 5.3.1) durchgeführt. Hierfür wurden Vero76-Zellen auf Deckgläsern (DG) in 24-well Platten ausgesät (siehe Kap. 5.2.4) und mit je 1 µg Plasmid-DNA, die entweder für KV-G oder NiV-G codieren, mittels LFA2000 transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). Um die Lokalisation beider Proteine innerhalb der Zelle eindeutiger bestimmen zu können, wurde 6 h p.t. eine zweite Transfektion mit einem Marker-Plasmid (pDsRed2-ER) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus dem Fluoreszenzfarbstoff DsRed und einem ER-Retentionssignal, das für eine Akkumulation des Markerproteins im ER sorgt und dieses so markiert. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Die G Proteine wurden zunächst mit einem anti-HA Primärantikörper (aus Kaninchen) und anschließend mit einem gegen Kaninchen gerichteten AF488-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Um die Zellkerne detektieren zu können, wurden die Präparate mit DAPI angefärbt.

Abb. 2.4 stellt die intrazelluläre Verteilung der KV-G und NiV-G Proteine in Vero76-Zellen in der Immunfluoreszenz dar. KV-G zeigt eine auffällige perinukleäre Akkumulation und eine nahezu komplette Kolokalisation mit dem ER-Marker, was durch die Gelbfärbung in der Überlagerung zu erkennen ist (Abb. 2.4A *merge*). Da es sich bei KV-G um ein Typ-II-Transmembranprotein handelt, welches an den Ribosomen des rauen ER synthetisiert wird, war eine teilweise Kolokalisation zu erwarten. Die Beobachtung, dass KV-G aber fast nur im ER und kaum in peripheren Regionen oder an der Plasmamembran zu detektieren ist (siehe Vergrößerungsausschnitt), deutet auf einen ineffizienten Oberflächentransport des Proteins hin. NiV-G zeigt ebenfalls eine starke Kolokalisation mit dem ER-Marker (Abb. 2.4B). Jedoch kann es auch in peripheren Regionen der Zelle und an der Plasmamembran deutlich nachgewiesen werden (siehe Vergrößerung). Diese Beobachtung bestätigt, dass NiV-G deutlich effizienter als das KV-G an die Zelloberfläche transportiert wird.

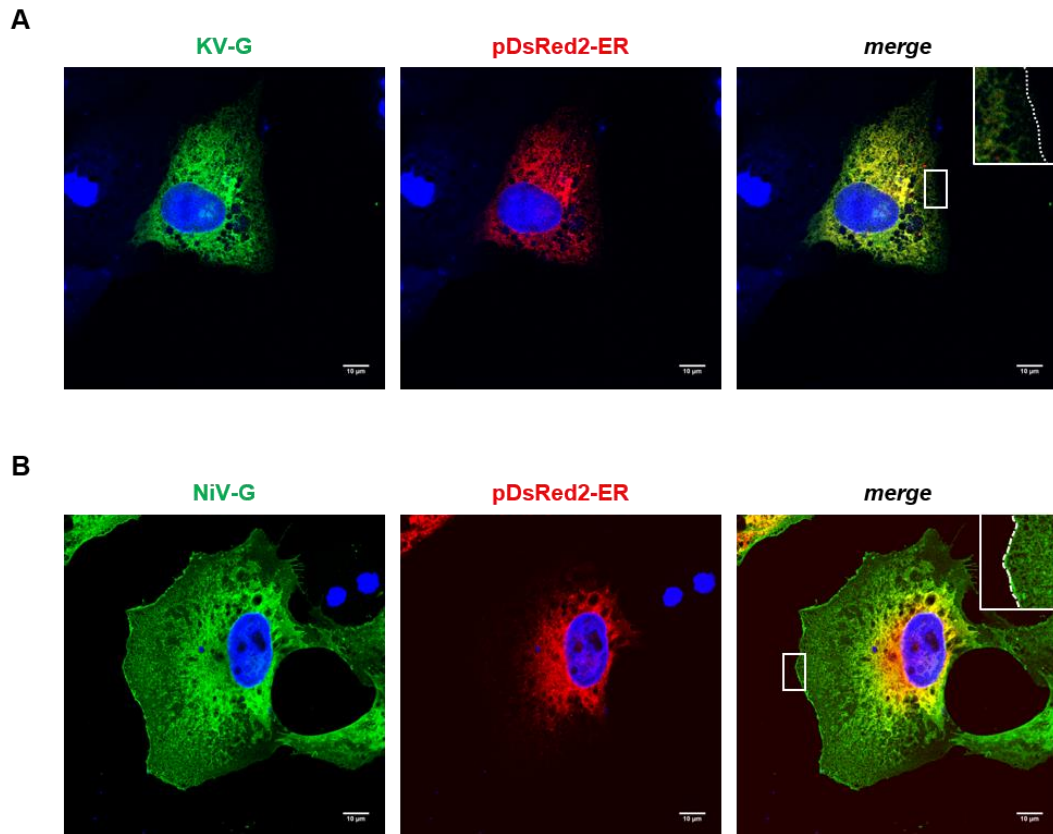


Abb. 2.4: Intrazelluläre Lokalisation der KV-G und NiV-G Proteine. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit je 1 µg pCG-KV-G oder pCG-NiV-G mittels LFA2000 transfiziert. 6 h p.t. wurde das ER-Marker Plasmid pDsRed-ER (1µg) hinzu transfiziert. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zum Nachweis des KV- bzw. NiV-G Proteins mit einem anti-HA Primärantikörper (1:200; aus Kaninchen) und einem AF488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:250; aus Ziege) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000) sichtbar gemacht. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl. Ausschnittsvergrößerung im Überlagerungsbild (*merge*). Zur Verdeutlichung der Zellmembran wurde eine gepunktete Linie im

Um zu untersuchen, ob eine Koexpression beider G Proteine den Oberflächentransport von KV-G beeinflussen kann, wurden auf DG ausgesäte Vero76-Zellen (siehe Kap. 5.2.4) mit pCG-NiV-G und pCG-KV-G im Verhältnis von 1:1 kotransfiziert (siehe Kap. 5.2.5). 24 h p.t. wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und durch 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert (siehe Kap. 5.3.1). Um beide Proteine einzeln nachweisen zu können, wurde ein 2xFLAG-markiertes KV-G und ein HA-markierte NiV-G Protein verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit anti-HA Antikörpern (aus Maus) zur Detektion des NiV-G Proteins und anti-FLAG Antikörpern (aus Kaninchen) zum Nachweis von KV-G und anschließend mit AF488- und AF568-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert.

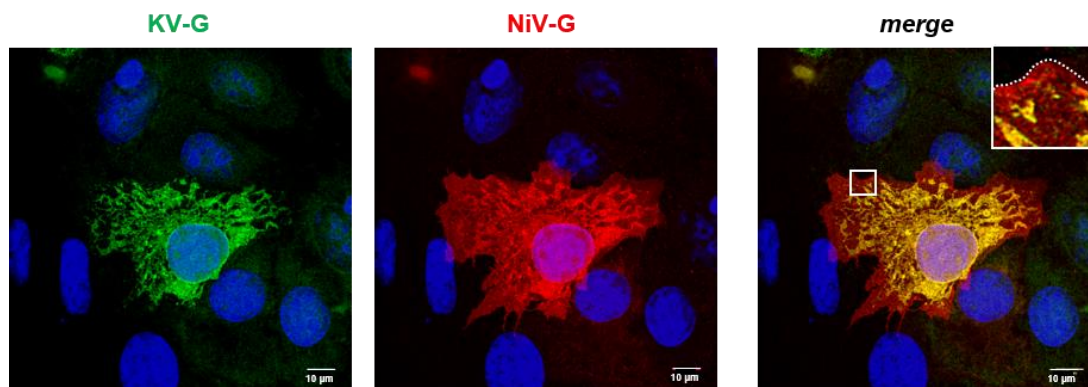


Abb. 2.5: Intrazelluläre Kolo­kalisierung der KV-G und NiV-G Proteine. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit Plasmiden, die für KV-G-2xFLAG und NiV-G-HA kodieren, im Verhältnis 1:1 mittels LFA2000 kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-HA (1:200; aus Maus) und anti-FLAG (1:100; aus Kaninchen) Primärantikörper und anschließend mit AF488-konjugierten sowie AF568-konjugierten Sekundärantikörpern (je 1:250; aus Ziege) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000) sichtbar gemacht. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl. Ausschnittsvergrößerung im Überlagerungsbild (*merge*). Zur Verdeutlichung der Zellmembran wurde eine gepunktete Linie im Vergrößerungsausschnitt eingefügt.

Abb. 2.5 zeigt die intrazelluläre Verteilung der KV-G und NiV-G Proteine bei Koexpression. Beide Proteine weisen eine ausgeprägte Kolo­kalisierung sowohl in perinukleären Bereichen, d.h. in ER-typischen Strukturen auf. In den peripheren Bereichen sowie an der Zellmembran kann jedoch nur NiV-G, wie schon in der Einzel­expression (siehe Abb. 2.4), nachgewiesen werden (vgl. Ausschnittsvergrößerung). Diese Beobachtungen bestätigen den ineffizienten Oberflächen­transport des KV-G Proteins. Zusätzlich lässt sich aus diesem Versuch schließen, dass sich beide Proteine während ihres intrazellulären Transports nicht gegenseitig beeinflussen.

2.4 Charakterisierung der N-Glykosylierungsstellen im KV-G Protein

2.4.1 Nachweis von Mannose-reichen und komplexen Zuckerketten im KV-G

Unterschiede in der Oberflächentransport-Kinetik von Glykoproteinen lassen sich gut anhand der verschiedenen Prozessierungsformen von N-Glykanen analysieren. Aus diesem Grund sollte nun das N-Glykosylierungsmuster des KV-G Proteins im Vergleich zu dem des NiV-G Proteins bestimmt werden. Glykoproteine, welche sich im ER befinden, besitzen ausschließlich Mannose-reiche Zuckerketten. Diese werden dort kotranslational an das Protein angehängt. Erreichen die Glykoproteine den Golgi-Apparat, so entstehen hier durch sogenanntes *trimming* komplex glykosylierte Zuckerketten. Die komplett prozessierten, reifen Proteine werden dann über das trans-Golgi-Netzwerk an die Oberfläche transportiert. Diese strukturellen Unterschiede macht man sich in einer Endoglykosidase-Behandlung mit den beiden Enzymen Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) zunutze: Während PNGase F alle Formen der N-Glykane abbauen kann, kann Endo H nur Mannose-reiche Zuckerketten abspalten. Komplex glykosylierte Glykane sind dementsprechend Endo H resistent (siehe Abb. 2.6).

Um den verzögerten Transport des KV-G Proteins aus dem ER zu bestätigen, wurde ein *Pulse Chase*-Versuch (siehe Kap. 5.3.9) mit anschließender Endoglykosidase-

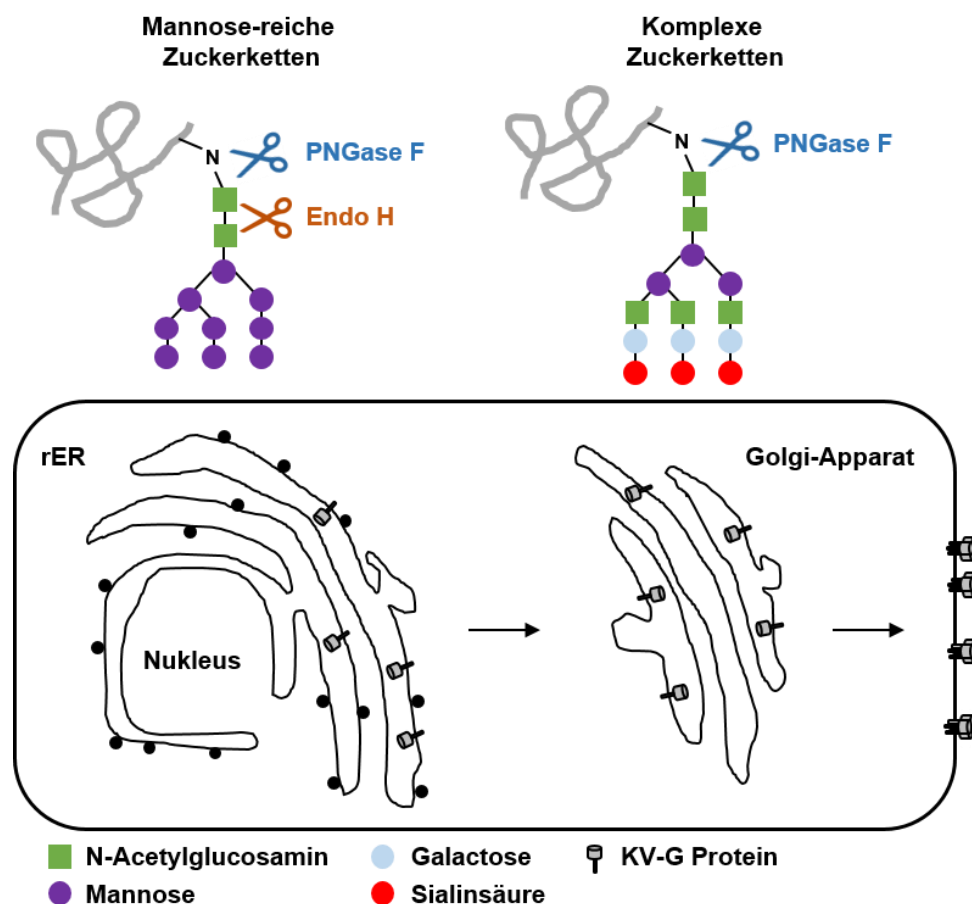


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Prozessierung von N-Glykanen.

Behandlung (siehe Kap. 5.3.10) durch die beiden Endoglykosidasen PNGase F und Endo H durchgeführt. Auf 6-wells ausgesäte Vero76-Zellen (siehe Kap. 5.2.4) wurden entweder mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G mit Hilfe von LFA2000 transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). 24 h p.t. wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C in Mangelmedium, welchem die beiden Aminosäuren Cystein und Methionin fehlen, inkubiert. Anschließend erfolgte für 30 min die radioaktive Markierung der Proteine mit [³⁵S]-Methionin/Cystein (Promix, 100 µCi) (*Pulse*). Danach wurden die Zellen gewaschen und entweder direkt in RIPA-Puffer lysiert (0 h-Werte) oder für weitere 2 h in nicht-radioaktivem *Chase*-Medium bei 37 °C inkubiert und dann lysiert (2 h-Werte). Im Anschluss erfolgte eine Immunpräzipitation (IP) der G-Proteine aus dem Zelllysats (siehe Kap. 5.3.5). Nachdem die Präzipitate in 2x Probenpuffer mit 4 % β-ME aufgekocht wurden, wurden sie mit den entsprechenden Glykosidasepuffern versetzt und für 1 h bei 37 °C mit der jeweiligen Endoglykosidase behandelt. Als Kontrolle diente ein Aliquot ohne Zugabe von Enzymen. Die Proteine wurden nach der Endoglykosidase-Behandlung unverzüglich in einer 10 %igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.6). Das Gel wurde nach dem Gellauf zunächst in *Enhancer*- und dann in Fixier-Lösung inkubiert und anschließend getrocknet. Zum Nachweis der radioaktiv-markierten G-Proteine wurde ein Röntgenfilm (*Medical X-Ray screen film blue sensitive*) für vier Tage aufgelegt und anschließend mittels BAS1000 Bio-Image Analyser (Fuji) entwickelt.

Wie in Abb. 2.7 zu erkennen ist, weisen die unbehandelten Proben von NiV-G bzw. KV-G eine Größe von 78 bzw. 85 kDa auf. Dies entspricht der vollständig glykosylierten Form der jeweiligen G-Monomere. Dimere oder höher oligomere Formen sind hier nicht nachweisbar, da die Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden. Die Behandlung der Proteine mit PNGase F oder Endo H führte sowohl bei NiV-G als auch bei KV-G bei der 0 h-Probe zu einer Veränderung im Laufverhalten. Die Monomer-Bande bei 80 bzw. 85 kDa ist komplett verschwunden und läuft nun für NiV-G bei 67 kDa und für KV-G bei 72 kDa, was jeweils der vollständig deglykosylierten Form der Proteine entspricht. Diese Beobachtung bedeutet, dass nach einem 30-minütigen *Pulse* alle N-Glykane der G-Proteine nur in Mannose-reicher Form vorliegen. Mannose-reiche Zuckerketten können sowohl durch PNGase F als auch durch Endo H abgespalten werden. Die Proben, die nach der radioaktiven Markierung für weitere 2 h in nicht-radioaktivem Medium inkubiert wurden (*Chase*), bevor die Endoglykosidase durchgeführt wurde, weisen ein anderes Laufverhalten auf. Hier lassen sich die Proteine zwar ebenfalls durch PNGase F vollständig deglykosylieren, durch die Behandlung mit Endo H jedoch nicht. Hier bleibt ein kleiner

Anteil an komplex glykosylierten, Endo H resistenten Proteinen sowohl bei NiV-G als auch bei KV-G zurück. Daraus lässt sich schließen, dass zu diesem Zeitpunkt neben Mannose-reichen Zuckerketten nun auch komplex glykosylierte N-Glykane vorliegen. Diese können zwar durch PNGase F, aber nicht durch Endo H abgebaut werden. Vergleicht man den Anteil Endo H resistenter Proteine, so fällt auf, dass dieser bei NiV-G deutlich größer ist. Hier sind ca. 22 % der Gesamtproteinmenge Endo H resistent, während es bei KV-G lediglich 2,7 % sind. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass KV-G weniger effizient aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert wird und somit nach 2 Stunden weniger komplex glykosylierte Zuckerketten enthält.

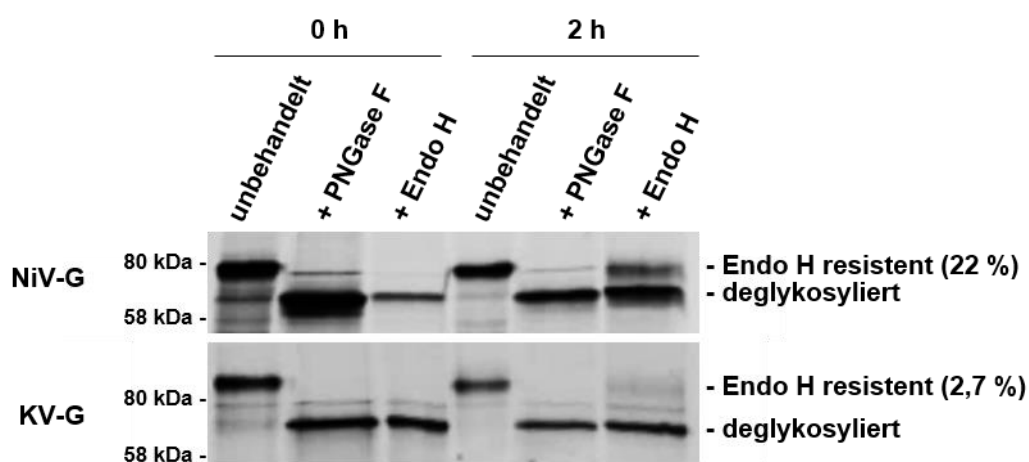


Abb. 2.7: Endoglykosidase-Behandlung von radioaktiv markierten NiV-G und KV-G Proteinen. Mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. für 30 min mit [35 S]-Methionin/Cystein (Promix, 100 μ Ci) radioaktiv markiert. Im Anschluss wurden die Zellen direkt mit RIPA lysiert (0 h) oder für weitere 2 h in Chase-Medium inkubiert (2 h). Nachdem die G-Proteine mit anti-HA Antikörpern (1:500; aus Kaninchen) immunpräzipitiert wurden, wurden die Proben mit 2x Probenpuffer (+ 4 % β -ME) versetzt und aufgeköcht. Für die Endoglykosidase-Behandlung wurden die Proben mit den entsprechenden Puffern und Enzymen (PNGase F 4 μ l oder Endo H 2 μ l) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden dann auf einer 10 %igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (Autoradiographie), welcher nach 5 Tagen mit einem BAS1000 Bio-Image Analyser (Fuji) entwickelt wurde. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Die Menge an Endo H resistenten G-Proteinen nach 2 Stunden ist in Prozent angegeben.

2.4.2 Charakterisierung von KV-G Glykosylierungsmutanten

Die Anzahl und Position von N-Glykosylierungsstellen in einem Protein können dessen Faltung, Stabilität oder Transporteigenschaften beeinflussen (Parodi, 2000; Shental-Bechor & Levy, 2008). Vergleicht man die Anzahl der potentiellen N-Glykosylierungsstellen von KV-G und NiV-G so fällt auf, dass sich diese unterscheiden.

KV-G besitzt neun, während NiV-G sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen aufweist (siehe Abb. 1.11).

Um zu klären welche Glykosylierungsstellen im KV-G genutzt werden - für NiV-G ist bereits bekannt, dass es sechs N-Glykane enthält (Biering *et al.*, 2012) -, sollte zunächst die N-Glykosylierung von KV-G analysiert werden. Damit sollte letztendlich die Frage beantwortet werden, ob Unterschiede in der N-Glykosylierung einen Einfluss auf den Oberflächentransport oder die Fusionshelferfunktion von KV-G haben. Zur Charakterisierung des N-Glykosylierungsmusters von KV-G sollten alle neun potentiellen N-Glykosylierungsstellen einzeln so verändert werden, dass sie nicht mehr glykosyliert werden können. Um dies zu gewährleisten wurde ein Glutamin (Q) anstatt des Asparagins (N) in der Konsensussequenz N-X-S/T eingefügt. Beide Aminosäuren werden als polar/neutral eingeordnet und zeigen einen vergleichbaren strukturellen Aufbau sowie eine vergleichbare Größe, sodass der Austausch dieser Aminosäure keinen weiteren Einfluss auf die Faltung des Proteins haben sollte. Die Mutanten (Δ G1 - Δ G9) wurden unter Verwendung des Q5 *Site-Directed* Mutagenese Kit (NEB) (siehe Kap. 5.1.9) hergestellt.

Nachdem die neun N-Glykosylierungsmutanten des KV-G erfolgreich hergestellt wurden, sollte überprüft werden, ob sie ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen. Weist eine Mutante eine geringere Laufhöhe als der Wildtyp auf, zeigt dies, dass die in dieser Mutante zerstörte N-Glykosylierungsstelle im Wildtyp KV-G glykosyliert wird. In der Mutante fehlt dieses N-Glykan, was einen Laufhöhenunterschied von ca. 3 kDa verursacht.

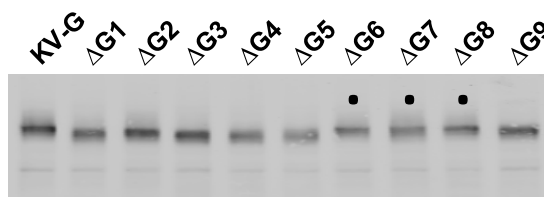


Abb. 2.8: Gesamtexpression der KV-G N-Glykosylierungsmutanten im Zelllysats. Mit pCG-KV-G oder der entsprechenden Mutante Δ G1 - Δ G9 transfierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mit EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert und anschließend mit Triton X-100 Puffer lysiert. 2 % des Zelllysates wurde zum Nachweis der Gesamtexpression verwendet. Alle Proben wurden auf einer 10 %igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis der G-Proteine im Western Blot erfolgte über anti-HA_{tag} spezifische Primärantikörper (1:1000; aus Maus) und IRDye800-gekoppelte Sekundärantikörper (1:5000). Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LI-COR). Mutanten, die die gleiche Laufhöhe wie der Wildtyp besitzen, sind mit einem Punkt (●) gekennzeichnet.

Abb. 2.8 zeigt die Gesamtexpression von KV-G Wildtyp und den Glykosylierungsmutanten in Zelllysaten nach einer Oberflächenbiotinylierung. Man kann erkennen, dass alle neun Mutanten exprimiert werden. Außer $\Delta G5$, welche schlechter als KV-G Wildtyp exprimiert wird, zeigen alle Mutanten ein vergleichbares Expressionsverhalten wie KV-G Wildtyp. Die Mutanten $\Delta G1$ - $\Delta G5$ sowie $\Delta G9$ zeigen ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Ihr Molekulargewicht beträgt lediglich ca. 82 kDa. Daraus lässt sich folgern, dass diese sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen auch tatsächlich glykosyliert werden. Dabei liegen die Glykosylierungsstellen G1 und G2 in der Stiel-domäne, während G3, G4, G5 und G9 in der globulären Kopfdomäne sitzen (vgl. Abb. 2.9). Die Mutanten $\Delta G6$ - $\Delta G8$ zeigen ein vergleichbares Molekulargewicht von ungefähr 85 kDa wie das KV-G Wildtyp-Protein, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese potentiellen N-Glykosylierungsstellen nicht verwendet werden. Von den neun potentiellen Glykosylierungsstellen werden also nur sechs tatsächlich glykosyliert. Dies entspricht der Anzahl an N-Glykanen in NiV-G und HeV-G (Biering *et al.*, 2012; Bradel-Tretheway *et al.*, 2015).

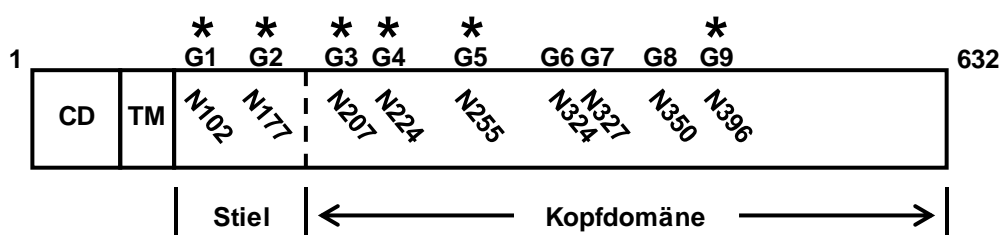


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der potentiellen und tatsächlichen N-Glykosylierungsstellen im KV-G Protein. Die sechs N-Glykosylierungsstellen, die tatsächlich verwendet werden, sind mit einem Stern (*) markiert. Die Zahlen zeigen die Positionen der Aminosäuren an. N= Asparagin; CD = zytoplasmatische Domäne; TM = Transmembrandomäne

Die in Abb. 2.8 dargestellte Gesamtexpression der N-Glykosylierungsmutanten stammten aus Zelllysate-Proben einer Oberflächenbiotinylierung. Hier wurden auf 6-wells ausgesäte Vero76-Zellen (siehe Kap. 5.2.4), die KV-G Wildtyp oder eine der Mutanten exprimieren, 24 h p.t. mit EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert (siehe Kap. 5.3.3). Die Oberflächen-biotinylierten G-Proteine wurden mit NeutrAvidin Beads präzipitiert und nach einer SDS-PAGE im Western Blot nachgewiesen und mit Hilfe der Software des Odyssey-Geräts (LI-COR) wurde dann die Gesamtmenge an Oberflächen-G-Protein quantifiziert (siehe Kapitel und Abb. 2.2). Um eine Aussage über die relative Oberflächenexpression geben zu können, wurden die

Bandenintensitäten mit denen aus Abb. 2.8 (Gesamtexpression der KV-G N-Glykosylierungsmutanten im Zelllysats) verrechnet.

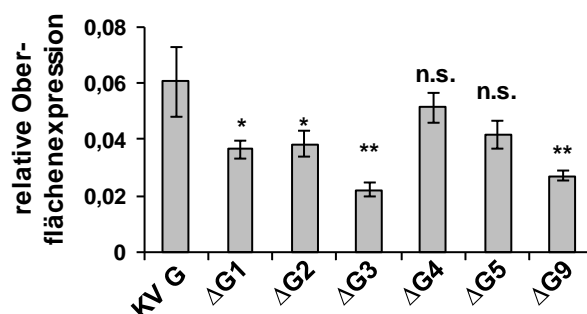


Abb. 2.10: Relative Oberflächenexpression der KV-G N-Glykosylierungsmutanten. Zur Berechnung der relativen Oberflächenexpression wurde das Verhältnis von Gesamt- und Oberflächenexpression der einzelnen Proteine durch Bestimmung der Bandenintensitäten ($n=3$) miteinander verrechnet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Statistische Signifikanz: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; n.s., nicht signifikant.

Die Berechnung der relativen Oberflächenexpression zeigt, dass die Mutanten, denen eine der tatsächlich genutzten N-Glykosylierungsstellen fehlt, entweder eine leichte ($\Delta G4$ und $\Delta G5$) oder eine signifikant reduzierte ($\Delta G1$, $\Delta G2$, $\Delta G3$ und $\Delta G9$) Oberflächenexpression aufweisen. Keine der Mutanten kann eine Steigerung in der Oberflächenexpression erzeugen. Diese Beobachtung zeigt, dass alle N-Glykosylierungsstellen, die tatsächlich verwendet werden, wichtig für den Oberflächentransport des KV-G Proteins sind.

2.4.3 Untersuchung der Fusionshelferaktivität der Glykosylierungsmutanten

Zur funktionellen Charakterisierung sollte die Fusionshelfereigenschaft der Glykosylierungsmutanten untersucht werden. Dafür wurden heterotypische Fusionsassays mit dem funktionellen NiV-F Protein in Vero76-Zellen durchgeführt (siehe Kap. 5.2.7).

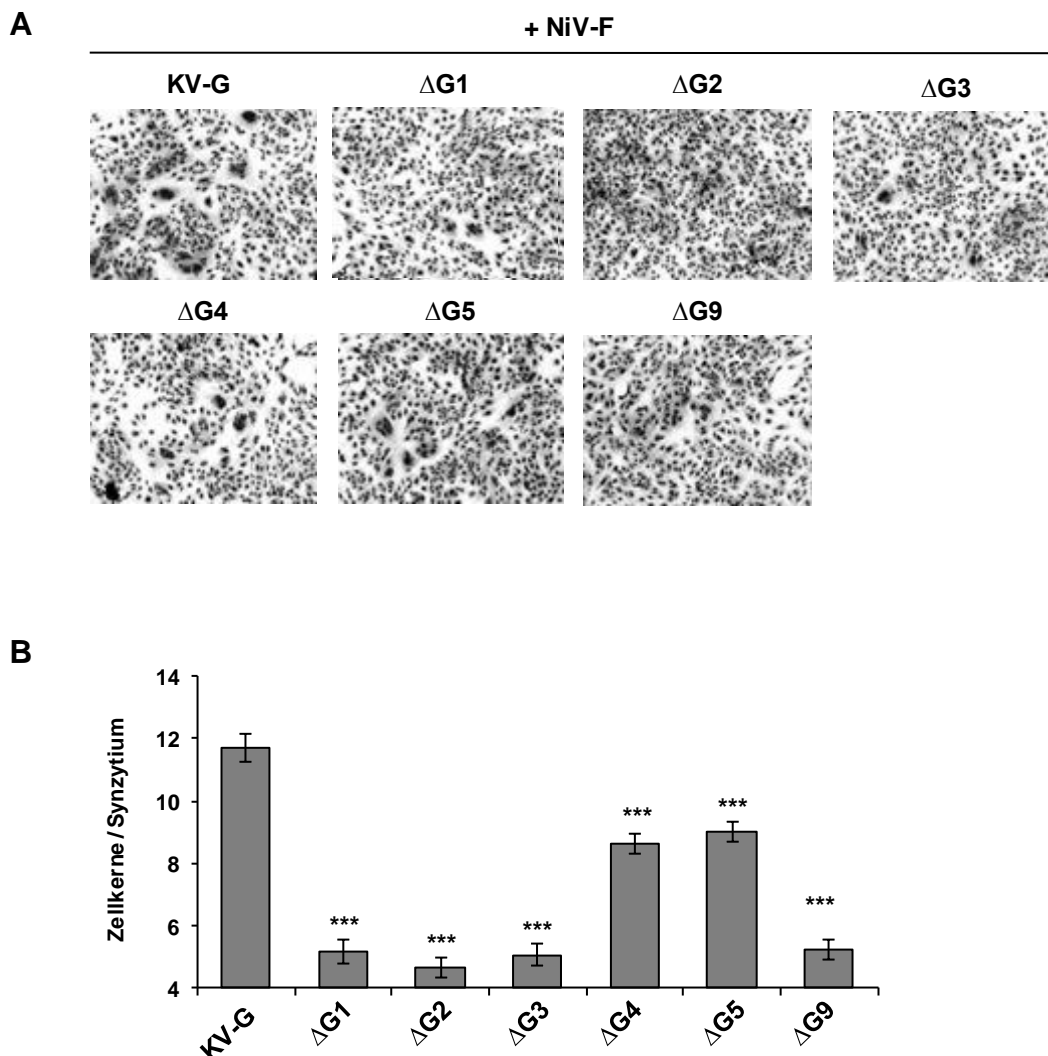


Abb. 2.11: Heterotypischer Fusionsassay des KV-G Wildtyp Proteins und der KV-G N-Glykosylierungsmutanten in Vero76-Zellen. A) Auf 6-well ausgesäte Vero76-Zellen wurden mit pCG-KV-G Wildtyp oder der entsprechenden Mutante und pCAGGS-NiV-F im Verhältnis von 1:1 mittels LFA2000 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellen wurden mittels Giemsa (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. B) Zur Quantifizierung der Synzytiengröße wurden 50 Blickfelder pro 6-well ausgezählt und der Mittelwert der Zellkerne pro Synzytium berechnet. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistische Signifikanz: *** p < 0,001

Der Fusionsassay in Abb. 2.11A zeigt für alle N-Glykosylierungsmutanten in Kotransfektion mit NiV-F eine geringere Synzytienbildung als das KV-G Wildtyp Protein. Diese Beobachtung wird durch die Quantifizierung (B) verdeutlicht. Während die Mutanten ΔG1-ΔG3 sowie ΔG9 nur eine sehr geringe Synzytienbildung unterstützen (durchschnittlich 5 Kerne pro Synzytium), zeigen ΔG4 und ΔG5 noch eine etwas bessere Fusionshelferfunktion (durchschnittlich 9 Kerne pro Synzytium). Dies

lässt sich wahrscheinlich durch die höhere relative Oberflächenexpression dieser beiden Mutanten erklären (vgl. Abb. 2.10). Im Vergleich zu KV-G Wildtyp (durchschnittlich 12 Kerne pro Synzytium) ist aber die Fusionshelferfunktion aller Mutanten trotzdem signifikant reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass alle sechs N-Glykane für den Oberflächentransport und die biologische Aktivität des KV-G Proteins notwendig sind.

2.5 Charakterisierung der Cysteine in der Stieldomäne des KV-G Proteins

NiV-G besitzt in der extrazellulären Stieldomäne drei Cysteine (C146, C158 und C162), die für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich sind. G-Monomere lagern sich dabei über die Bildung einer doppelten Disulfidbrücke der beiden Cysteine C158 und C162 zu Dimeren zusammen. Zwei Dimere bilden anschließend über eine weitere Disulfidbrücke an der Position C146 ein stabiles Tetramer aus (Maar *et al.*, 2012; vgl. Abb. 1.9). Ein Vergleich mit der Aminosäuresequenz der Stieldomäne des KV-G zeigt, dass auch hier drei Cysteine an ähnlichen Positionen mit gleichen Abständen vorhanden sind: C162, C174 und C178 (vgl. Abb. 2.12A). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese drei Cysteine ebenfalls für die Oligomerisierung des G Proteins zuständig sind.

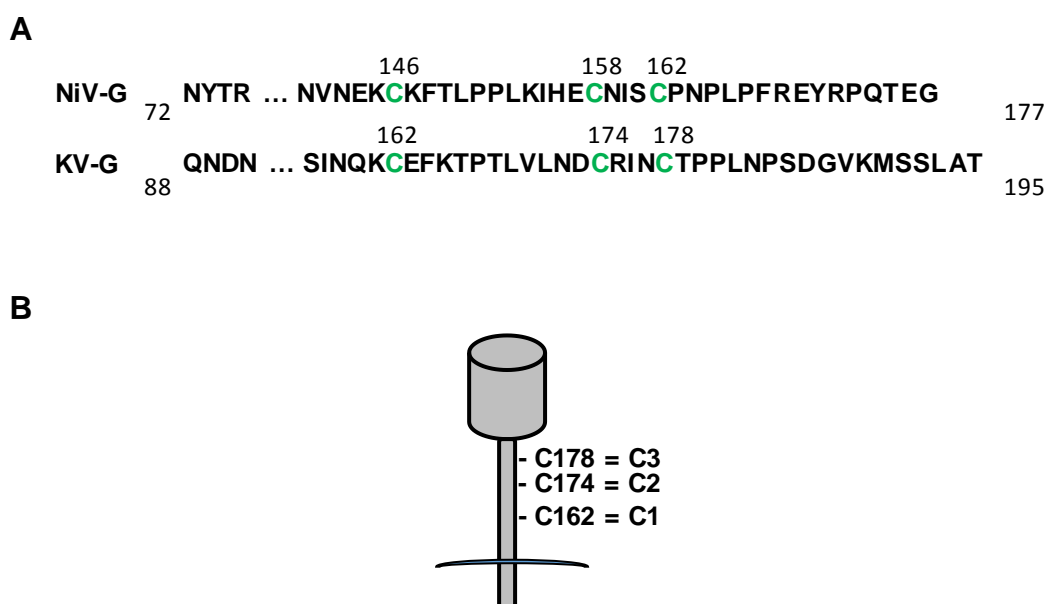


Abb. 2.12: Aminosäuresequenzvergleich der KV-G und NiV-G Stieldomänen und schematische Darstellung des KV-G Proteins. A) Sequenzvergleich der NiV-G und KV-G Stieldomänen. Cysteine, die für die Oligomerisierung wichtig sind, sind grün markiert. Die Nummerierung zeigt die Aminosäureposition an. B) Schematische Darstellung eines KV-G Monomers mit Kennzeichnung der drei relevanten Cysteine in der extrazellulären Stieldomäne.

2.5.1 Untersuchungen zur KV-G Oligomerisierung

Um zunächst zu klären, welche oligomeren Formen das KV-G Protein bildet, wurde es in einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Dafür wurden Vero76-Zellen, die mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfiziert waren (siehe Kap. 5.2.5), mittels RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden in 2x PP, welchem weder DTT noch β -ME zugegeben wurde, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.6) und auf eine NC-Membran transferiert (siehe Kap. 5.3.7). Da dem Probenpuffer kein reduzierendes Agens hinzugegeben wurde, bleiben alle kovalenten Bindungen erhalten. Somit werden ausgebildete Disulfidbrücken nicht aufgelöst und die stabilen oligomeren Formen der NiV-G und KV-G Proteine können im Western Blot detektiert

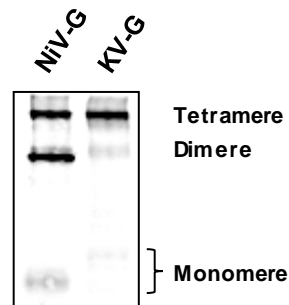


Abb. 2.13: Expression der oligomeren Formen von KV-G und NiV-G. Mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. für 30 min mit RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels anti-HA_{tag} Antikörper (1:1000; aus Maus) und IRDye800-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000; aus Ziege). Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LI- werden.

Abb. 2.13 zeigt die oligomeren Formen der NiV-G und KV-G Proteine. Wie bereits bekannt, kommt NiV-G in Monomeren, Dimeren und hoch oligomeren Formen vor. Dabei werden die dimeren und tetrameren Formen in einem Verhältnis 1:1 exprimiert (vgl. Maar *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu NiV-G wird KV-G fast ausschließlich in hocholigomeren Formen (Tetramere) exprimiert. Dimere und Monomere sind kaum vorhanden. Quantifizierungen der Bandenintensitäten zeigten, dass das Verhältnis von Tetrameren zu Dimeren hier bei ungefähr 9:1 liegt. Die unterschiedlichen Höhen der NiV- und KV-G Monomere sind auf die unterschiedlich langen Aminosäuresequenzen und somit verbundenen Molekulargewichte von NiV und KV zurückzuführen (602 bp und 78 kDa für NiV-G sowie 632 bp und 85 kDa für KV-G). Bei den höher oligomeren Formen sind diese Unterschiede nicht mehr zu erkennen.

Um auszuschließen, dass der geringe Anteil an dimeren Formen des KV-G Proteins darauf zurückzuführen ist, dass diese abgebaut werden, wurde ein *Pulse Chase*-Versuch (siehe Kap. 5.3.9) durchgeführt (siehe Abb. 2.14). Hierfür wurden die mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfizierten Vero76-Zellen jeweils für 30 min mit [³⁵S]-Cystein/Methionin (Promix, 100 µCi) radioaktiv markiert und entweder direkt lysiert (0 h-Werte) oder für zwei weitere Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend lysiert (2 h-Werte). Die Proben wurden dann unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.6) und mittels Autoradiographie detektiert.

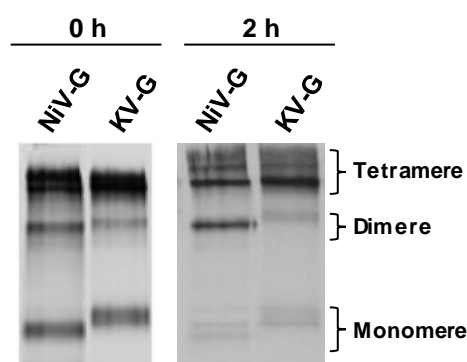


Abb. 2.14: Nachweis der Expression der oligomeren Formen von KV-G und NiV-G mittels *Pulse Chase*-Analyse. Mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. für 30 min mit einem [³⁵S]-Promix radioaktiv markiert. Im Anschluss wurden die Zellen direkt lysiert (0 h) oder für weitere 2 h in *Chase*-Medium inkubiert (2 h). Nachdem die Proteine mit anti-HA_{tag} Antikörpern (1:500; aus Kaninchen) immunpräzipitiert wurden, wurden die Proben mit 2x PP (ohne β-ME) aufgekocht. Die Proteine wurden auf einer 10 %igen SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie.

Direkt nach der radioaktiven Markierung (0 h) werden sowohl NiV-G als auch KV-G in monomerer, dimerer und hoch oligomerer Form exprimiert. Zu diesem frühen Zeitpunkt sind bereits bei KV-G weniger Dimere als bei NiV-G vorhanden, während die Mengen an Tetrameren und Monomeren vergleichbar stark exprimiert zu sein scheinen. Dieser Unterschied in der Dimer-Menge wird zu dem späteren Zeitpunkt (2 h) noch deutlicher. Während NiV-G ein Verhältnis von Dimer zu Tetramer von 1:1 aufweist, sind ca. 90 % des exprimierten KV-G Proteins als Tetramer vorhanden. Im Vergleich zu den 0 h-Werten sind die monomeren Formen beider Proteine nach 2 h kaum noch nachzuweisen, was darauf zurückzuführen ist, dass sich diese zu oligomeren Formen zusammen gelagert haben.

Insgesamt haben die Untersuchungen der oligomeren KV-G Formen im Western Blot und *Pulse Chase*-Experiment gezeigt, dass bei KV-G die Menge an Dimeren konstant

gering ist, weil sich Monomere stabil in Tetramere zusammenlagern und nicht, weil die dimeren Formen abgebaut werden.

2.5.2 Charakterisierung der KV-G Stieldomänen-Mutanten

Um die Rolle der drei Cysteine in der Stieldomäne des KV-G Proteins (vgl. Abb. 2.12B) hinsichtlich der Oligomerisierung näher zu analysieren, sollten diese einzeln oder in Kombination durch Serine ersetzt werden. Während Cysteine eine Thiolgruppe besitzen, tragen Serine eine Hydroxylgruppe. Der Aminosäureaustausch führt also dazu, dass keine Disulfidbrücken mehr gebildet werden können. Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hat Louisa Zimmermann die Einzelmутanten (^{mut}C1, ^{mut}C2 und ^{mut}C3) erzeugt und charakterisiert (Bachelorarbeit Louisa Zimmermann, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden die Doppelmутanten (^{mut}C1+C2, ^{mut}C2+C3 und ^{mut}C1+C3) und eine Trippelmутante (^{mut}C1+C2+C3) erstellt (vgl. Abb. 2.15). Alle Mutanten wurden mit Hilfe des Q5 *Site-Directed* Mutagenese Kits (NEB; siehe Kap. 5.1.9) erstellt.

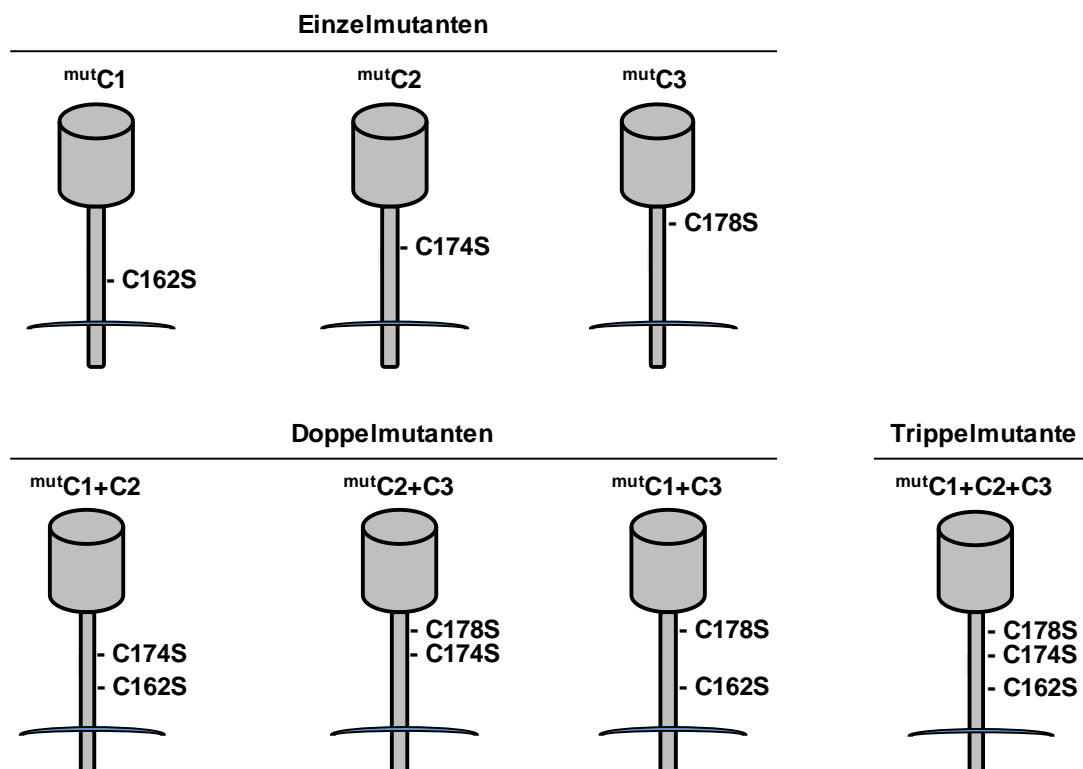


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der hergestellten Cystein-Stieldomänen-Mutanten des KV-G Proteins. Die Cysteine in der Stieldomäne, welche jeweils gegen ein Serin ausgetauscht wurden, sind in jeder Mutante eingezeichnet.

Um den Einfluss jedes einzelnen Cysteins in der Stieldomäne auf die Oligomerisierung des KV-G Proteins genauer zu untersuchen, wurden Vero76-Zellen mit Plasmiden, die entweder für das Wildtyp KV-G Protein oder die jeweilige Mutante kodieren, transfiziert. Die Expression der Proteine wurde 24 h nach der Transfektion sowohl im Zelllysats als auch auf der Oberfläche mittels Oberflächenbiotinylierung analysiert (siehe Kap. 5.3.3). Zum Nachweis der verschiedenen oligomeren Formen wurden die Proteine in einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.6), sodass die kovalenten Bindungen zwischen einzelnen Monomeren nicht aufgelöst

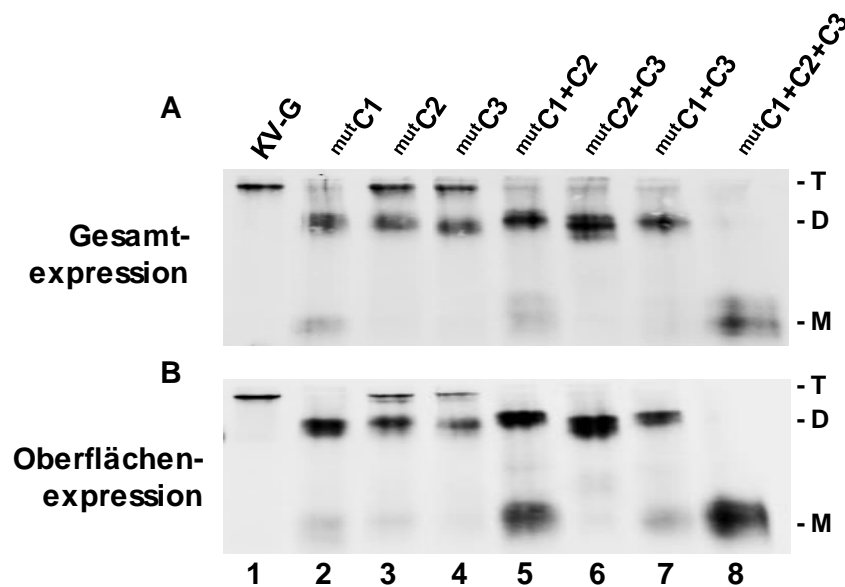


Abb. 2.16: Nachweis der Gesamt- und der Oberflächenexpression der Cystein-Stieldomänen-Mutanten des KV-G Proteins. Mit pCG-KV-G oder mit Plasmiden, die für die entsprechende Cysteinmutanten codieren, transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert und anschließend mit Triton X-100 Puffer lysiert. 2 % des Zelllysates wurde zum Nachweis der Gesamtexpression (A) verwendet. Die Oberflächenproteine wurden über NeutrAvidin-Beads präzipitiert (B). Die Proben wurden in einer 10 % igen SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im anschließenden Western Blot über anti-HA_{tag} spezifische Primärantikörper (1:1000; aus Maus) und fluoreszierende IRDye800-gekoppelte Sekundärantikörper (1:5000; aus Ziege). Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LI-Cor). T=Tetramere, D=Dimere, M=Monomere

werden.

Wie man in Abb. 2.16 erkennen kann, werden alle Cystein-Stieldomänen-Mutanten des KV-G Proteins exprimiert (A) und auch auf die Oberfläche (B) transportiert. Auffällig ist, dass alle Mutanten ein anderes oligomeres Expressionsmuster als das wildtypische

KV-G Protein (Spur 1) zeigen. Die Trippelmutante (^{mut}C1+C2+C3; Spur 8) wird ausschließlich als Monomer exprimiert. Daraus lässt sich folgern, dass die drei Cysteine in der Stiel-domäne für die Oligomerisierung von KV-G verantwortlich sind, genau wie im NiV-G Protein (Maar *et al.*, 2012). Allerdings scheinen die einzelnen Cysteinreste andere Funktionen zu haben, denn die Einzel- und Doppelmutanten von KV-G zeigen ein anderes oligomeres Verhalten als die von Maar und Kollegen (2012) beschriebenen Cysteinmutanten. Sowohl die Einzelmutanten (Spur 2-4), als auch die Doppelmutanten (Spur 5-7) werden hauptsächlich als Dimere exprimiert (bei NiV-G nur Monomere, Maar *et al.*, 2012). Aus den oligomeren Formen der drei KV-G Doppelmutanten (überwiegend Dimere) lässt sich schließen, dass das Vorhandensein eines einzelnen Cysteins in der Stiel-domäne ausreichend ist, um Dimere zu bilden. Dabei ist es nicht von Bedeutung, welches der drei Cysteine vorliegt. Ein einziges Stiel-Cystein ist jedoch nicht ausreichend für eine Tetramerisierung. Während die beiden Einzelmutanten ^{mut}C2 und ^{mut}C3 (Spur 3 und 4) neben Dimeren zusätzlich auch Tetramere ausbilden können, ist ^{mut}C1 dazu nicht in der Lage. Diese Mutante wird, wie die Doppelmutanten, fast ausschließlich in Dimeren exprimiert (Spur 2). Dies besagt, dass für die Generierung von höher oligomeren Formen (Tetrameren) das Vorhandensein von C1 an Position C162 unabdingbar ist. Zusätzlich zu C1 muss ein weiteres Cystein vorliegen, C2 oder C3. Betrachtet man die Oberflächenexpression der Mutanten, so fällt auf, dass hier alle Mutanten in den gleichen oligomeren Formen wie im Zelllysate exprimiert werden (vgl. Abb. 2.16 B). Zusätzlich kann man erkennen, dass alle Mutanten eine vergleichbare Expressionsstärke auf der Zelloberfläche aufweisen, die der Gesamt-Expressionsstärke im Zelllysate entspricht. Dies bedeutet, dass keine der Mutanten einen offensichtlichen Transportdefekt im Vergleich zum KV-G Wildtyp Protein zu haben scheint.

2.5.3 Fusionshelferaktivität der Cystein-Stiel-domänen-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die Fusionshelferfunktion durch die Veränderung in den Oligomerisierungsformen beeinflusst wird, wurde wieder ein heterotypischer Fusionsassay mit den einzelnen Cystein-Mutanten in Kombination mit dem NiV-F Protein durchgeführt (siehe Kap. 5.2.7).

Wie in Abb. 2.17 zu erkennen ist, führt keine der Cysteinmutanten in Koexpression zusammen mit dem funktionellen NiV-F Protein zur Synzytienbildung. Daraus lässt sich schließen, dass alle Cystein-Mutanten einen erheblichen Defekt in der Fusionshelferfunktion besitzen. Interessanterweise führen auch ^{mut}C2 und ^{mut}C3 nicht

zur Ausbildung von Zell-Zell-Fusion, obwohl sie die den gleichen Phänotyp wie NiV-G hinsichtlich des Verhältnisses der oligomeren Formen (Dimer-Tetramer Verhältnis von 1:1) aufweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass jegliche Veränderungen im Oligomerisierungsmuster von KV-G dessen Fusionshelferfunktion signifikant negativ beeinflussen, obwohl die Oberflächenexpression nicht reduziert ist (vgl. Abb. 2.16B).

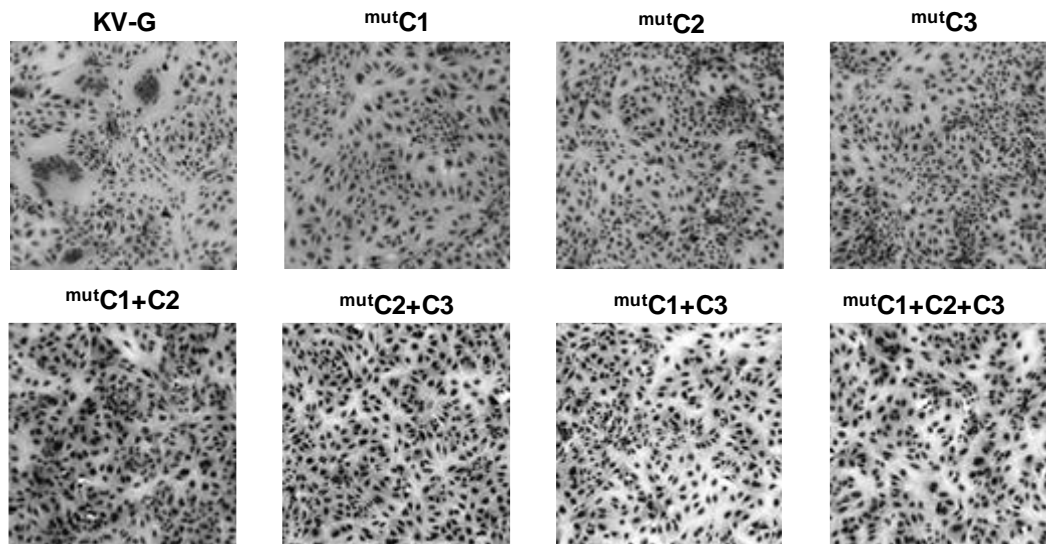
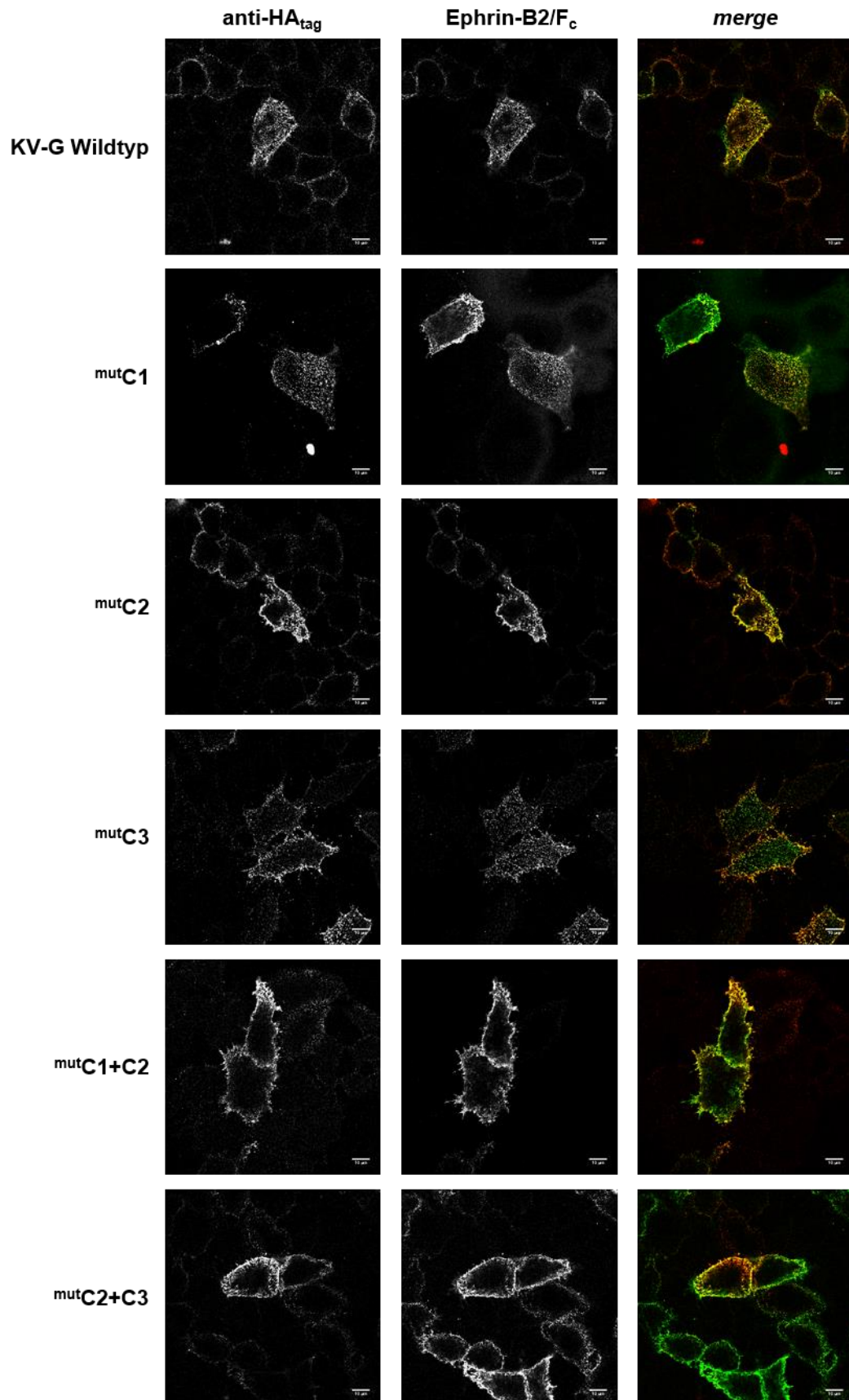


Abb. 2.17: Heterotypischer Fusionsassay der KV-G Cystein Stieldomänen-Mutanten. Vero76-Zellen wurden entweder mit pCG-KV-G Wildtyp oder mit Plasmiden, die für die entsprechende Cystein-Mutante kodieren und pCAGGS-NiV-F im Verhältnis von 1:1 mittels LFA2000 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellkerne wurden mittels Giemsa (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. Die Bilder zeigen einen repräsentativen Ausschnitt.

Um die Ursache für die fehlende Zell-Zell-Fusion aufzuklären, sollte die Rezeptorbindung der Cysteinmutanten überprüft werden. Hierfür wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (siehe Kap. 5.3.1) durchgeführt. Ephrin-B2 negative Hela-Zellen, die zuvor auf DG in 24-well Vertiefungen ausgesät wurden (siehe Kap. 5.2.4), wurden mit Plasmiden, die entweder für KV-G Wildtyp oder die entsprechenden Cysteinmutanten kodieren, mit LFA2000 transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). 24 h p.t. wurden die Zellen lebend zum Nachweis der KV-G Oberflächenexpression mit anti-HA_{tag} Antikörpern (aus Maus) und AF568-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Um die Bindung von KV-G an Ephrin-Rezeptoren zu testen, wurde ein lösliches Rezeptor-Fc-Fusionsprotein verwendet (0,4 µg Ephrin-B2/Fc). Die erfolgreiche KV-G-

Rezeptorbindung wurde im Anschluss über die Detektion des humanen Fc-Teils mit Hilfe eines FITC-gekoppelten anti-human Antikörpers nachgewiesen.



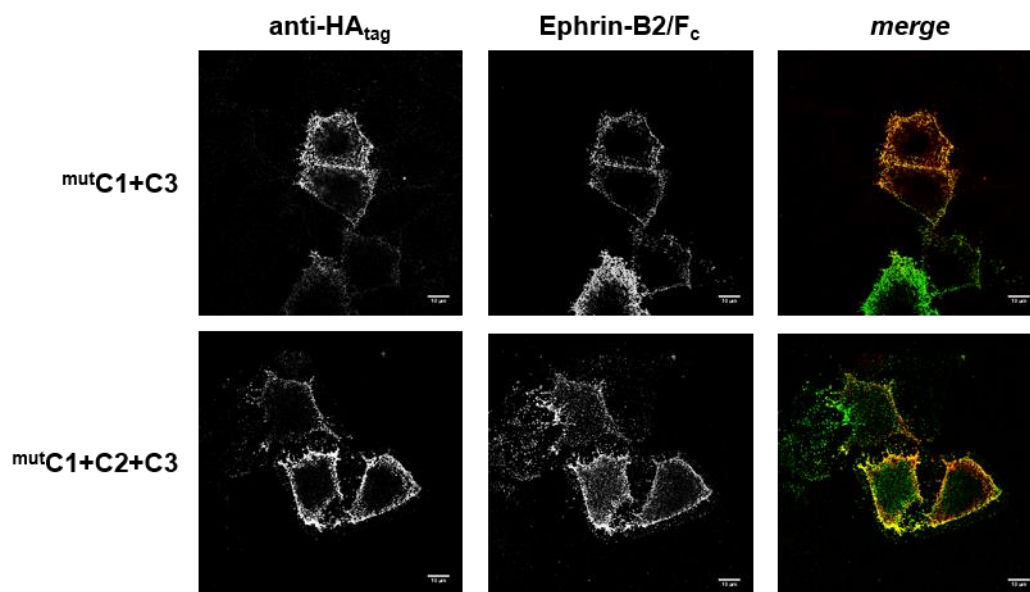


Abb. 2.18: Co-Immunfärbung des KV-G Wildtyp Proteins und der Cystein-Stieldomänen-Mutanten auf der Zelloberfläche durch HA_{tag} spezifische Antikörper und lösliche NiV-Rezeptoren (Ephrin-B2/Fc). G-transfizierte HeLa-Zellen wurden 24 h p.t. lebend mit anti-HA_{tag} Primärantikörpern (1:200; aus Maus) sowie EphrinB2/Fc (0,4 µg) für 45 min bei 4°C inkubiert. Zum Nachweis des anti-HA_{tag} wurden AF568-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus (1:250; aus Ziege) verwendet. An die verschiedene KV-G Proteine gebundenes Ephrin-B2/Fc wurde durch anti-human IgG FITC (1:100; aus Kaninchen) nachgewiesen. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl.

Die Abb.2.18 zeigt jeweils eine starke Oberflächenexpression der KV-G Proteine sowohl in der Färbung mit anti-HA_{tag} als auch in der Färbung mit den löslichen NiV-Rezeptoren (Ephrin-B2/Fc). Zudem ist in der Überlagerung (*merge*) eine Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale in Gelb zu erkennen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor Ephrin-B2 bei allen Mutanten noch möglich ist. Eine fehlende Rezeptorbindung ist somit nicht für die fehlende Zell-Zell-Fusion verantwortlich. Es muss daher angenommen werden, dass auf Grund der unterschiedlichen Oligomerbildung die Cystein-Stieldomänen-Mutanten das sogenannte *F-triggering* (siehe Kap. 1.7.2) nicht mehr effizient unterstützen und somit keine Zell-Zell-Fusion stattfindet.

2.6 Untersuchung eines nicht konservierten Endozytose-Motivs in der zytoplasmatischen Domäne des KV-G Proteins

Bei einem Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domäne des KV-G Proteins mit anderen Henipavirus G-Proteinen fällt auf, dass das KV-G ein klassisches Yxx ϕ Endozytose-Motiv besitzt. Hierbei steht das Y für ein Tyrosin, x für eine beliebige Aminosäure und ϕ für eine Aminosäure mit hydrophoben Seitenketten, meist Leucin. Dieses Motiv ist im NiV-G Protein nicht vorhanden (vgl. Abb. 2.19) und könnte somit neben den Oligomerisierungsunterschieden ein weiterer Faktor sein, der die konstitutive Oberflächenexpression des KV-G Proteins verringert.

NiV-G	1	MPAENKKVRFENTTSDKGKIPSKVIKSYYGTM	45	DIKKINEGLLDK...
KV-G	1	MPQKTVEFINMNSPLERGVSTLSDKKT	38	<u>YFGL</u> GSHSERNWKKQKNQNDHYMT...
KV-G _{Y38A}		MPQKTVEFINMNSPLERGVSTLSDKKT		AFGLGSHSERNWKKQKNQNDHYMT...

Abb. 2.19: Vergleich der Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen von NiV-G und KV-G. Die Zahlen zeigen die Positionen der Aminosäuren an. Die fett gedruckten und unterstrichenen Buchstaben zeigen das Endozytose-Motiv YFGL im KV-G Protein. Die eingefügte Mutation Y38A ist ebenfalls fettgedruckt.

Da der Vorgang der Endozytose die Oberflächenexpression eines Proteins herunter regulieren kann, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob das Endozytose-Motiv Y₃₈FGL im KV-G Protein funktionell ist. Dafür wurde die Mutante KV-G_{Y38A} mit Hilfe des Q5 Site-Directed Mutagenese Kits (NEB, siehe Kap. 5.1.9) erstellt, bei der das funktionell wichtige Tyrosin an Position 38 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 2.18). Durch diesen Aminosäureaustausch sollte das Endozytose-Signal zerstört und damit funktionsunfähig gemacht werden.

2.6.1 Qualitativer Nachweis der Internalisierung durch einen *antibody uptake* Assay

Zunächst sollte untersucht werden, ob das Y₃₈FGL Motiv funktionsfähig ist und zur Endozytose des an der Oberfläche exprimierten KV-G Proteins führt. Dafür wurde ein *antibody uptake* Assay durchgeführt (siehe Kap. 5.3.2) (Vogt *et al.*, 2005). Hierfür wurden Vero76-Zellen mit pCAGGS-NiV-F, pCG-NiV-G, pCG-KV-G oder der Mutante pCG-KV-G_{Y38A} transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). 24 h p.t. wurden die unfixierten Zellen mit einem Primärantikörper gegen das jeweilige Oberflächenprotein auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 30 min inkubiert, um Endozytose der Oberflächenproteine zu ermöglichen. Dann erfolgte eine Inkubation mit einem AF488-konjugierten Sekundärantikörper bei 4 °C, der alle Antikörper-markierte Proteine, die

sich noch auf der Oberfläche befanden, detektierte. Nachdem die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und permeabilisiert wurden, erfolgte eine zweite Inkubation mit einem AF568-gekoppelten Sekundärantikörper, um internalisierte Proteine nachzuweisen.

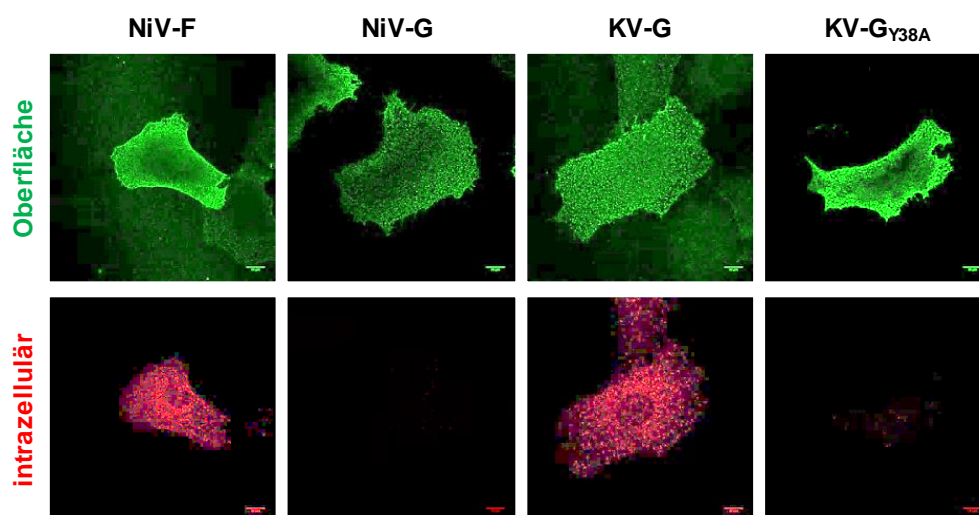


Abb. 2.20: Untersuchung der Endozytose des KV-G Proteins und der KV-G_{Y38A} Mutante mittels antibody uptake Assay. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit Plasmiden, die für NiV-F, NiV-G, KV-G oder KV-G_{Y38A} codieren, mittels LFA2000 transfiziert. 24 h p.t. wurden die G-Protein exprimierenden Zellen unfixiert mit anti-HA (1:200; aus Kaninchen) und die F-Protein exprimierenden Zellen mit einem anti-NiV Serum (1:1000; aus Meerschweinchen) jeweils bei 4 °C für 45 min inkubiert, um die Oberflächenproteine zu markieren. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C in Zellkulturmedium ohne FCS inkubiert, um Endozytose der Antikörper-markierten Oberflächenproteine zuzulassen. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem AF488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:50; aus Ziege) bei 4 °C (Oberfläche). Nachdem die Zellen mit Met/Ac permeabilisiert und fixiert wurden, erfolgte erneut eine Inkubation mit einem AF568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:250; aus Ziege), um internalisierte Proteine nachzuweisen (intrazellulär). Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl.

Abb. 2.20 zeigt eindeutig, dass die Positivkontrolle NiV-F, welches ein gut charakterisiertes Internalisierungssignal besitzt (Vogt *et al.*, 2005), endozytiert wurde. Hier ist nach 30 min internalisiertes NiV-F deutlich erkennbar. Bei NiV-G hingegen sind keine intrazellulären Proteine nachweisbar. Dies war zu erwarten, weil es kein klassisches Endozytose-Signal besitzt und lediglich passiv beim konstitutiven Umsatzes der Plasmamembran (*membran turn over*) internalisiert wird (Vogt *et al.*, 2005). Für KV-G ist nach 30 min eine starke intrazelluläre Fluoreszenz zu erkennen. Das bedeutet, dass KV-G ebenso wie NiV-F konstitutiv endozytiert wird. Im Gegensatz zum KV-G Wildtyp zeigt die Mutante KV-G_{Y38A} kein internalisiertes Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Y₃₈FGL Motiv ein funktionelles Endozytose-Signal im KV-G Protein darstellt.

2.6.2 Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Chlorpromazin-Behandlung der Zellen

NiV-F wird über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, weil es ein klassisches Endozytose-Motiv Yxx ϕ enthält (Vogt *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob KV-G auch über Clathrin-umhüllte Vesikel internalisiert wird, wurde ein *antibody uptake* Assay durchgeführt (siehe Kap. 5.3.2), bei dem die Zellen mit Chlorpromazin (25 μ M) behandelt wurden. Chlorpromazin induziert die Formation von Clathrin-Gittern an den endosomalen Membranen, wodurch die Bildung von Clathrin-haltigen Vesikeln an der Plasmamembran und damit die Endozytose verhindert wird (Wang *et al.*, 1993).

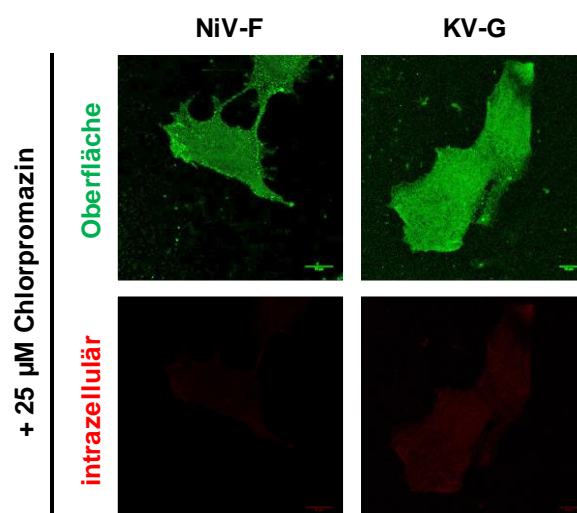


Abb. 2.21: Einfluss von Chlorpromazin auf die Endozytose des KV-G Proteins. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit Plasmiden, die für NiV-F oder KV-G kodieren mittels LFA2000 transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit Chlorpromazin (10 μ M in 500 μ l DMEM ohne FCS pro DG) für 30 min vorinkubiert. Dann wurden die G-Protein exprimierenden Zellen unfixiert mit anti-HA (1:200; aus Kaninchen) und die F-Protein exprimierenden Zellen mit einem anti-NiV Serum (1:1000; aus Meerschweinchen) bei 4 °C für 45 min inkubiert, um die Oberflächenproteine zu markieren. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C in Zellkulturmedium (ohne FCS, mit 25 μ M Chlorpromazin) inkubiert, um Nicht-Clathrin-vermittelte Endozytose-Vorgänge zuzulassen. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem AF488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:50; aus Ziege) bei 4 °C. Nachdem die Zellen mit Met/Ac permeabilisiert und fixiert wurden, erfolgte erneut eine Inkubation mit einem AF568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:250; aus Ziege), um internalisierte Proteine nachzuweisen. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl.

In Abb. 2.21 kann deutlich beobachtet werden, dass die an der Oberfläche exprimierten NiV-F Proteine nach der Chlorpromazin-Behandlung nicht mehr internalisiert werden können. Ein vergleichbares Bild erhalten wir auch für die KV-G

exprimierenden Zellen. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abb.2.20) ist hier lediglich das Protein auf der Oberfläche, aber nicht intrazellulär in Endozytose-Vesikeln zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass KV-G genau wie NiV-F über den Weg der Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird.

2.6.3 Untersuchung der Ko-Endozytose von NiV-F und KV-G Proteinen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl NiV-F als auch KV-G mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert werden, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob beide Proteine auch in den gleichen Endozytosevesikeln vorliegen. Dafür wurde ein *antibody uptake* Assay mit Vero76-Zellen durchgeführt, die KV-G und NiV-F auf ihrer Oberfläche koexprimieren (siehe Kap. 5.3.2).

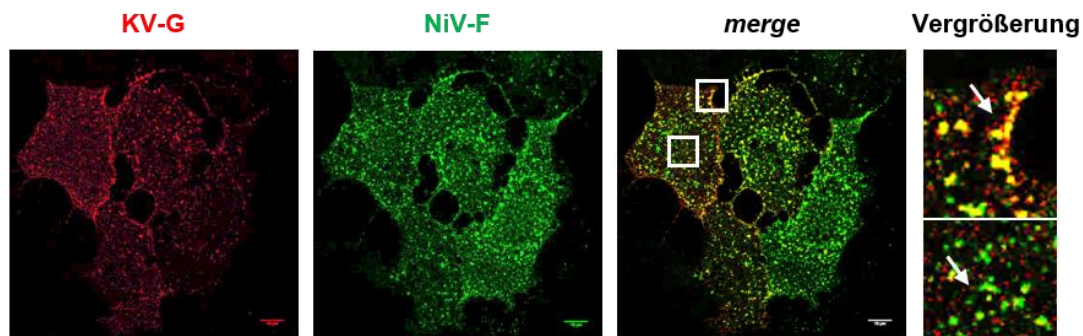


Abb. 2.22: Endozytose von NiV-F und KV-G in Koexpression. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit Plasmiden, die für NiV-F und KV-G kodieren, im Verhältnis 1:1 mittels LFA2000 kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen unfixiert mit anti-HA (1:100; aus Maus) und mit einem anti-NiV Serum (1:1000; aus Meerschweinchen) bei 4 °C für 45 min inkubiert, um beide Proteine an der Oberfläche zu färben. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C in Zellkulturmedium (ohne FCS) inkubiert, um Endozytose zuzulassen. Danach erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 45 min zur Absättigung der an der Oberfläche verbliebenen Protein-Primärantikörper-Komplexe mit HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:10; aus Ziege). Nachdem die Zellen mit Met/Ac permeabilisiert und fixiert wurden, erfolgte erneut eine Inkubation mit einem anti-Maus AF568- und einem anti-Meerschweinchen AF488-gekoppelten Sekundärantikörper (jeweils 1:250; aus Ziege), um internalisierte Proteine nachzuweisen. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) in der 630 x Vergrößerung mit Öl.

Die intrazelluläre Färbung in Abb. 2.22 zeigt, dass auch bei einer Koexpression von KV-G (rot) und NiV-F (grün) beide Proteine endozytiert werden (siehe Einzelkanäle). Eine Überlagerung beider internalisierten Proteine zeigt außerdem, dass sich die Verteilung der Proteine grundsätzlich ähnelt (siehe *merge*). Es gibt Bereiche, in denen beide Proteine kolokalisieren, wodurch die Endozytose-Vesikel gelb erscheinen (Pfeil im oberen Vergrößerungsausschnitt). Diese befinden sich eher im peripheren Bereich

der Zelle, direkt an der Plasmamembran (wahrscheinlich in *early endosomes*). Betrachtet man jedoch die Vesikel weiter im Inneren der Zelle, so gibt es hier hauptsächlich NiV-F positive Vesikel, die in grün dargestellt sind (Pfeil im unteren Vergrößerungsausschnitt). Einzelne rote Vesikel sind seltener zu erkennen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass beide Proteine zunächst in die gleichen endosomalen Vesikel gelangen (*early endosomes*), sie jedoch dann in andere endosomale Kompartimente (*recycling endosomes*, *late endosomes*, ...) weiter transportiert werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste man Kofärbungen mit endosomalen Markerproteinen durchführen.

2.6.4 Quantifizierung der Endozytoserate von KV-G durch „MESNA-Reduktion“

Um zu analysieren, wie effizient KV-G im Vergleich zu NiV-F endozytiert wird, wurde eine „MESNA-Reduktion“ durchgeführt (siehe Kap. 5.3.4). Mit Hilfe einer „MESNA-Reduktion“ lässt sich die Endozytoserate einzelner Proteine quantifizieren. Hierfür wurden Vero76-Zellen, die 24 h zuvor mit pCG-KV-G, pCG-KV-G_{Y38A}, pCG-NiV-G oder pCAGGS-NiV-F transfiziert wurden, mit NHS-S-S-Biotin auf Eis markiert. Hierbei handelt es sich um eine Form von Biotin, welche durch die Zugabe von β -ME abgespalten werden kann. Durch die Markierung auf Eis wird die Endozytose zunächst unterbunden. Anschließend wurden die Zellen für unterschiedlich lange Zeitintervalle (0 bis 30 min) bei 37 °C in Zellkulturmedium ohne FCS inkubiert, um die Endozytose der Oberflächenproteine zuzulassen. Auf der Oberfläche verbliebenes Biotin wurde durch Inkubation mit 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) abgespalten. Biotin, welches durch die Endozytose von Oberflächenproteinen internalisiert wurde, ist vor der Reduktion geschützt. Die Zellen wurden dann in RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert, bevor die Proteine über Nacht immunpräzipitiert wurden. Nach Fällung der Immunkomplexe mit Protein A-Sepharose wurden die Präzipitate in 2x PP ohne β -ME aufgenommen und in einer SDS-PAGE (siehe Kap. 5.3.6) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (siehe Kap. 5.3.7) konnten die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin/Peroxidase detektiert und über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden (siehe Kap. 5.3.8).

Als Kontrolle dienten zwei Ansätze, welche nicht bei 37 °C inkubiert wurden. Einer von diesen Ansätzen wurde anschließend mit MESNA reduziert („MESNA-Kontrolle“). Hier sollten keine biotinylierten Proteine mehr nachweisbar sein. Die zweite Kontrolle blieb unbehandelt. Diese „Gesamt-Biotin-Kontrolle“ stellt die Gesamtmenge an biotinyliertem Oberflächenprotein (100 %) dar. Zur Abschätzung der Menge an internalisierten

Proteinen wurde 50 % dieser Kontrolle aufgetragen. Die „MESNA-Kontrolle“ soll Auskunft darüber geben, ob die Reduktion vollständig abgelaufen ist. Ist hier eine schwache Bande zu detektieren, so wird sie als Hintergrundwert von den Werten aller Endozytose-Zeiten abgezogen. Die Endozytose-Raten der Proteine werden durch den Vergleich der Bandenintensitäten nach verschiedenen Endozytose-Zeiten mit den Intensitäten der Kontrolle, die nicht durch MESNA reduziert wurden, bestimmt. Die aus der MESNA-Reduktion ermittelten Endozytose-Raten der G-Proteine sowie des F-Proteins sind in der Tabelle Abb.2.23B dargestellt.

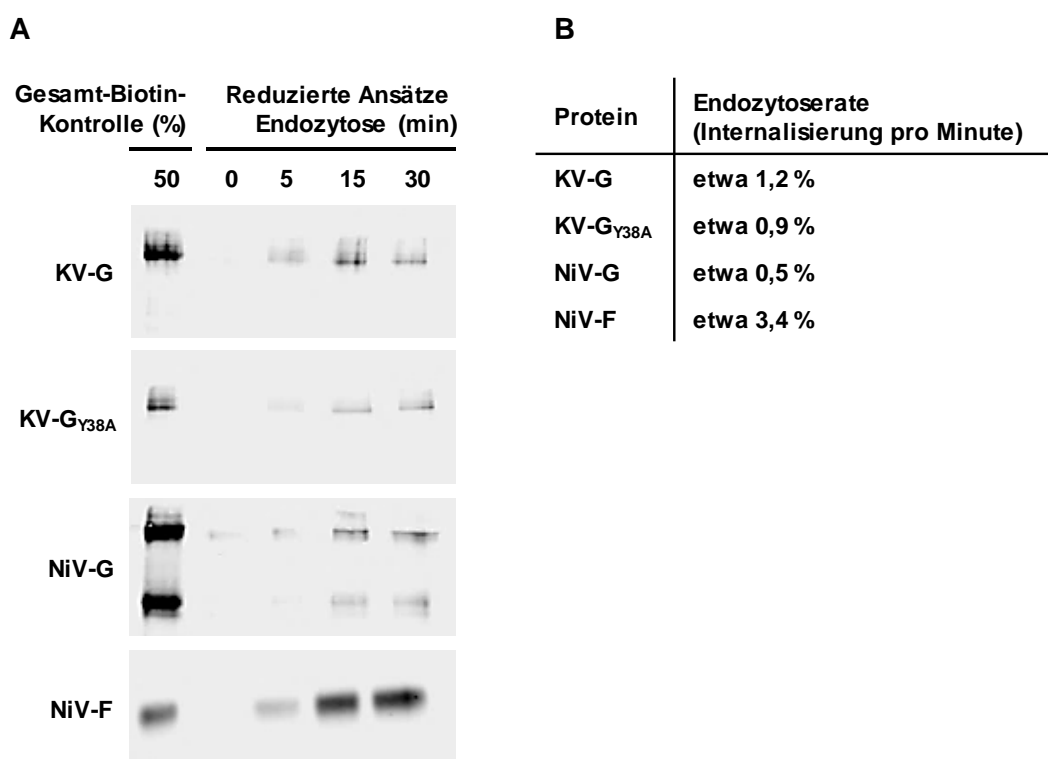


Abb. 2.23: Quantifizierung der Endozytose-Rate des KV-G Wildtyp-Proteins und der KV-G Endozytose-Mutante mittels „MESNA-Reduktion“. A) Mit pCG-KV-G, pCG-KV-G_{Y38A}, pCG-NiV-G oder pCAGGS-NiV-F transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. auf Eis mit Sulfo-NHS-S-S-Biotin markiert und für unterschiedliche Zeiten (0, 5, 15 und 30 min) mit Zellkulturmedium (ohne FCS) bei 37 °C inkubiert. Auf der Oberfläche verbliebenes Biotin wurde anschließend durch die Zugabe von MESNA abgespalten, bevor die Zellen lysiert und die Proteine mit einem anti-HA Antikörper (1:500, aus Kaninchen) immunpräzipitiert wurden. Die Präzipitate wurden in 2x PP ohne β -ME aufgenommen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die biotinylierten Proteine wurden mittels Streptavidin/Peroxidase (1:2000) detektiert und durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die „Gesamt-Biotin-Kontrolle“ wurde weder bei 37 °C inkubiert noch durch MESNA reduziert. Hiervon wurden 50 % der Gesamtmenge aufs Gel aufgetragen. Dieser Wert dient als Vergleichswert zur Bestimmung der Endozytoserate. Der reduzierte Ansatz „0 min Endozytose“ stellt die „MESNA-Kontrolle“ dar (vgl. auch Kapitel 5.3.3 und Abb. 5.5). B) Aus der MESNA-Reduktion ermittelte Endozytoseraten für KV- und NiV-Glykoproteine.

Die „MESNA-Reduktion“ in Abb. 2.23A und die tabellarische Übersicht der Endozytose-Raten in Abb. 2.23B zeigen eine unterschiedlich effiziente Endozytose-Rate der verschiedenen G-Proteine sowie des NiV-F Protein, was bereits im *antibody uptake* Assay (vgl. Abb. 2.20) angedeutet wurde. Wie erwartet zeigt NiV-F die stärkste und effizienteste Endozytose-Rate von durchschnittlich über 3 % pro Minute. Ebenfalls wie erwartet zeigt das NiV-G Protein kaum internalisiertes Protein. Hier konnte eine durchschnittliche Endozytose-Rate von lediglich 0,5 % pro Minute bestimmt werden, was eher einer passiven und nicht aktiven Internalisierung des Proteins entspricht. Auf Grund der Tatsache, dass die Proben unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden und somit die kovalenten Bindungen zwischen zwei Monomeren nicht aufgelöst wurden, sind hier Proteinbanden für sowohl Dimere als auch Tetramere sichtbar. Da KV-G fast ausschließlich in tetramerer Form exprimiert wird, ist das Protein nur in dieser Form zu detektieren. Passend zu der nur partiellen Kolo-kalisation von endozytierten NiV-F und KV-G (vgl. Abb. 2.22) ist die Endozytose-Rate der beiden Proteine unterschiedlich, obwohl beide ein klassisches Clathrin-Endozytosesignal enthalten. KV-G wird zwar schneller als NiV-G aber deutlich langsamer als NiV-F mit einer Rate von durchschnittlich 1,2 % pro Minute internalisiert. Interessanterweise steigt die Menge an endozytiertem Protein nach 15 Minuten nicht mehr weiter an, sondern sinkt eher. Dafür könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein: Entweder wird endozytiertes KV-G im Lysosom abgebaut, oder aber es wird ganz schnell wieder an die Plasmamembran recyclet und ist dann nicht mehr detektierbar, weil die Biotinmarkierung der bereits internalisierten Proteine auf der Oberfläche durch MESNA abgespalten wurde. Durch das Zerstören des YFGL Endozytose-Signals im KV-G kann die Rate auf durchschnittlich 0,9 % pro Minute verringert werden (vgl. Abb. 2.23 KV-G_{Y38A}).

2.6.5 Einfluss der Y38A Mutation auf die Oberflächenexpression von KV-G

Um zu klären welchen Einfluss die Zerstörung des Endozytose-Signals auf die Oberflächenexpression von KV-G hat, wurde eine Oberflächenbiotinylierung (siehe Kap. 5.3.3) durchgeführt.

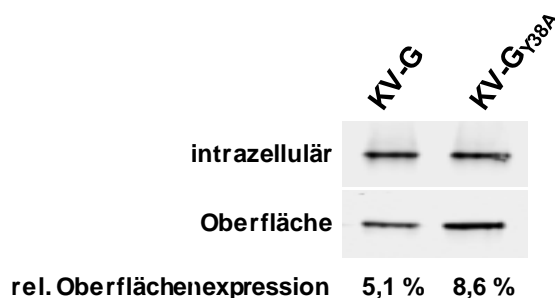


Abb. 2.24: Gesamt- und Oberflächenexpression des KV-G Wildtyp Proteins und der Endozytose-Mutante KV-G_{Y38A}. Mit pCG-KV-G oder pCG-KV-G_{Y38A} transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert und anschließend mit Triton X-100 Puffer lysiert. Die Oberflächenproteine wurden über NeutrAvidin-Beads präzipitiert (Oberfläche). 2 % des Überstandes wurden verwendet um die Expression der intrazellulären Proteine nachzuweisen (intrazellulär). Die Proben wurden auf einer 10 % igen SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine NC-Membran wurden die G-Proteine im Western Blot über anti-HA_{tag} spezifische Primärantikörper (1:1000; aus Maus) und IRDye800-gekoppelte Sekundärantikörper (1:5000; aus Ziege) nachgewiesen. Die Auswertung und Quantifizierung der Bandenstärke erfolgte am Odyssey-Gerät (LI-Cor).

Abb. 2.24 zeigt die intrazelluläre Expression (obere Bande) sowie die Oberflächenexpression (untere Bande) des KV-G Wildtyp Proteins im Vergleich zur Mutante KV-G_{Y38A}. Während die intrazellulären Expressionslevel der beiden Proteine sehr ähnlich sind, lässt sich bei der Oberflächenmarkierung eine stärkere Bande für die Mutante KV-G_{Y38A} detektieren. Die Berechnung der relativen Oberflächenexpression ergab für KV-G 5,1 % und für die Mutante 8,6 % der jeweiligen Gesamtproteinmengen, was einer mehr als 1,5-fachen Erhöhung entspricht. Diese leicht erhöhte Oberflächenexpression der Mutante ist sehr wahrscheinlich auf das nicht mehr funktionelle Endozytose-Signal zurückzuführen.

2.6.6 Fusionshelferaktivität der Endozytose-Mutante KV-G_{Y38A}

Um zu testen, ob die Zerstörung des Endozytose-Motivs nicht nur die Oberflächenexpression positiv beeinflusst, sondern auch die Fusionshelfereigenschaft des Proteins verbessern kann, wurde ein heterotypischer Fusionsassay (siehe Kap. 5.2.7) durchgeführt.

Abb. 2.25 zeigt die Fusion von NiV-F in Koexpression mit KV-G oder KV-G_{Y38A}. Bei beiden Koexpressionen konnte nach 48 h p.t. eine vergleichbar starke Synzytienbildung beobachtet werden. Die Quantifizierung der Synzytiengröße ergab sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante durchschnittlich 14 Zellkerne pro

Synzytium. Somit zeigt die Mutante KV-G_{Y38A} zwar eine leicht erhöhte Oberflächenexpression, jedoch keine gesteigerte Fusionshelferaktivität.

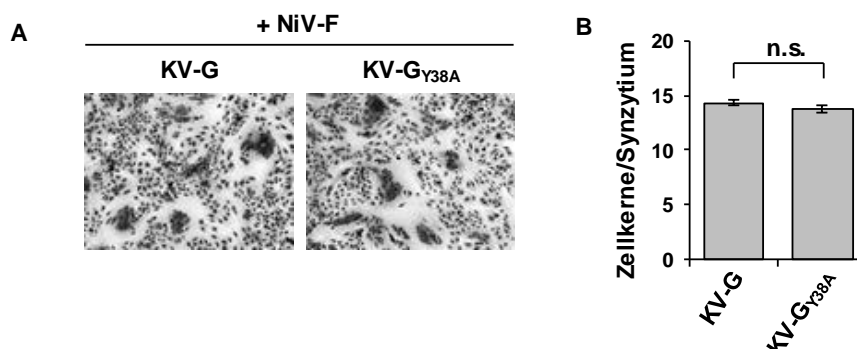


Abb. 2.25: Heterotypischer Fusionsassay der KV-G_{Y38A} Mutante. A) Vero76-Zellen wurden entweder mit pCG-KV-G Wildtyp oder pCG-KV-G_{Y38A} und pCAGGS-NiV-F im Verhältnis 1:1 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellkerne wurden mittels Giemsa (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung der Synzytien erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. Die Bilder zeigen einen repräsentativen Ausschnitt. B) Zur Quantifizierung der Synzytiengröße wurden 50 Blickfelder pro 6-well ausgezählt und der Mittelwert der Zellkerne pro Synzytium berechnet. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistische Signifikanz: n.s. (nicht signifikant) $p > 0,1$.

2.7 Untersuchung der Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S}

2.7.1 Untersuchung der Kopfdomänen-Mutante KV-G_{C314S}

Das KV-G Protein besitzt drei nicht konservierte Cysteine (C314, C378 und C422) in der globulären Kopfdomäne (siehe Abb. 2.26A). Diese sind im NiV-G Protein nicht vorhanden. Die Cysteine in der Kopfdomäne spielen keine Rolle bei der Oligomerisierung, sondern gehen intramolekulare Disulfidbrückenbindungen ein. Diese sind für die korrekte Faltung des Proteins von zentraler Bedeutung. Um den Einfluss dieser zusätzlichen Cysteine auf die Expression und Funktion des KV-G Proteins näher untersuchen zu können, wurden diese Cysteine einzeln durch Serine ersetzt. Wie in der Bachelorarbeit von Louisa Zimmermann (2015) beschrieben, führte die Mutation an C378 und C422 zu einem KV-G Protein, das sehr schnell degradiert wird. Eine Mutation an C314 dagegen verbesserte die Fusionshelferfunktion von KV-G.

Wie in Abb. 2.26 dargestellt ist, konnte das Ergebnis von L. Zimmermann (2015) für die C314S-Mutante bestätigt werden. Die Oberflächenbiotinylierung (siehe Kap. 5.3.2) zeigt, dass die Mutante KV-G_{C314S} eine vergleichbare Oberflächenexpression wie das Wildtyp KV-G Protein aufweist (vgl. Abb. 2.26B). Es besitzt jedoch eine signifikant verbesserte Fusionshelferfunktion. Der Fusionsassay (siehe Kap. 5.2.7) zeigt, dass es

im Vergleich zum Wildtyp KV-G Protein zur Ausbildung von größeren Synzytien kommt, wenn die Mutante KV-G_{C314S} mit NiV-F koexprimiert (vgl. Abb. 2.26C). Die durchschnittliche Größe der Synzytien konnte von 14 auf 18 Kerne signifikant gesteigert werden (vgl. Abb. 2.26D).

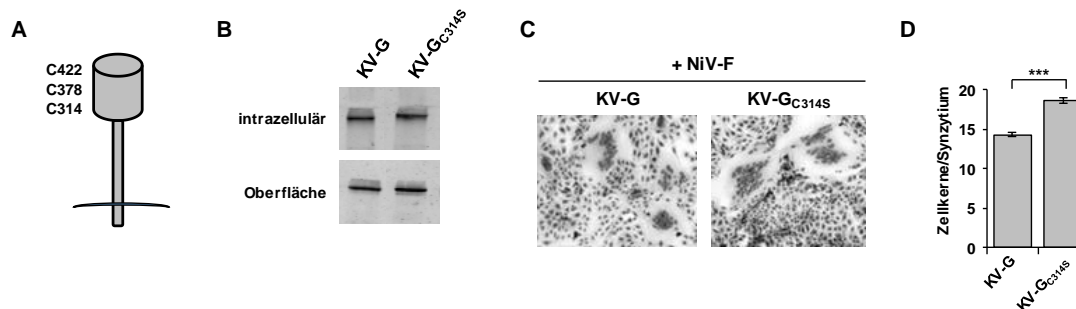


Abb. 2.26: Oberflächenexpression und Funktionshelferfunktion der KV-G_{C314S} Mutante in Vero76-Zellen. A) Schematische Darstellung der drei nicht konservierten Cysteine in der KV-G Kopfdomäne. B) Mit pCG-KV-G oder pCG-KV-G_{C314S} transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert und anschließend mit Triton X-100 Puffer lysiert. Die Oberflächenproteine wurden über NeutrAvidin-Beads präzipitiert (Oberfläche). 2 % des Überstandes wurden verwendet, um die Expression der intrazellulären Proteine nachzuweisen (intrazellulär). Die Proben wurden in einer 10 % igen SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte über anti-tag spezifische Primärantikörper (1:1000; aus Maus) und IRDye800-gekoppelte Sekundärantikörper (1:5000; aus Ziege). Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LI-Cor). C) Vero76-Zellen wurden entweder mit pCG-KV-G Wildtyp oder pCG-KV-G_{C314S} und pCAGGS-NiV-F im Verhältnis 1:1 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellkerne wurden mit Giemsa-Lösung (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung der Synzytien erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. Die Bilder zeigen einen repräsentativen Ausschnitt. D) Zur Quantifizierung der Synzytiengröße wurden 50 Blickfelder pro 6-well ausgezählt und der Mittelwert der Zellkerne pro Synzytium gebildet. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistische Signifikanz: *** p < 0,001

2.7.2 Charakterisierung der KV-G_{Y38A+C314S} Doppelmutante

Um zu testen, ob eine Kombination der beiden funktionell wichtigen Punktmutationen Y38A (führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression) und C314S (führt zu einer gesteigerten Fusionshelferfunktion) einen additiven Effekt aufweisen, wurde die Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} mit Hilfe des Q5 *Site-Directed* Mutagenese Kit (NEB; siehe Kap. 5.1.9) erstellt. Die Fusionshelferfunktion der Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} im Vergleich zur Mutante KV-G_{C314S} wurde dann in einem heterotypischen Fusionsassay (vgl. Kap. 5.2.7) untersucht.

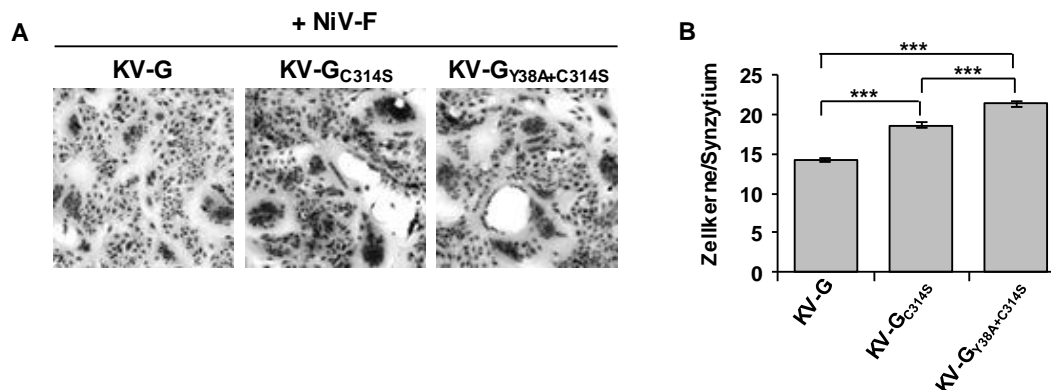


Abb. 2.27: Heterotypischer Fusionsassay der KV-G_{Y38A+C314S} Doppelmutante in Vero76-Zellen. A) Vero76-Zellen wurden mit pCG-KV-G Wildtyp oder der entsprechenden Mutante und pCAGGS-NiV-F 1:1 mittels LFA2000 transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Die Zellkerne wurden mittels Giemsa (1:10 in dH₂O verdünnt) für 30 min angefärbt. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 200-fache Vergrößerung. B) Zur Quantifizierung der Synzytiengröße wurden 50 Blickfelder pro 6-well ausgezählt und der Mittelwert der Zellkerne pro Synzytium gebildet. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistische Signifikanz: *** p < 0,001

Das Ergebnis ist in Abb. 2.27A gezeigt. Sowohl das Wildtyp KV-G Protein als auch die Mutante KV-G_{C314S} und die Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} unterstützen die NiV-F Protein vermittelte Synzytienbildung. Die Quantifizierung der durchschnittlichen Synzytiengrößen (B) zeigte dann, dass die Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} zu einer signifikanten Steigerung in der durchschnittlichen Synzytiengröße im Vergleich zu KV-G Wildtyp und auch im Vergleich zu KV-G_{C314S} führt. Die Fusionshelfereigenschaft von KV-G kann durch Einfügen dieser zwei Mutationen auf 21 Kerne im Vergleich zu 14 Kerne pro Synzytium (KV-G Wildtyp) signifikant gesteigert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass lediglich zwei Punktmutationen ausreichend sind, um die eingeschränkte Fusionshelferaktivität von KV-G signifikant zu steigern. Somit konnte zum ersten Mal erfolgreich eine *gain of function* Mutante eines Glykoproteins eines afrikanischen Henipavirus generiert werden.

III Diskussion

Die Koexpression der Kumasivirus (KV) Glykoproteine G und F führt in Henipavirus-permissiven Zelllinien nicht zur charakteristischen Zell-Zell-Fusion und zur Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen, den sogenannten Synzytien (Weis, Behner *et al.*, 2014). In einem heterotypischen Fusionsassay findet man jedoch eine limitierte Synzytienbildung (vgl. Abb. 2.1). Das zeigt, dass das KV-G in Koexpression mit einem funktionellen Henipavirus F-Protein prinzipiell biologisch aktiv ist. Die im Vergleich zu NiV-G deutlich geringere Fusionshelferfunktion konnte auf eine schwache Oberflächenexpression des KV-G Proteins zurückgeführt werden. Durch das Einfügen zweier Punktmutationen, Y38A im Endozytose-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne und C314S in der globulären Kopfdomäne, konnte die Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins signifikant gesteigert werden. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur detaillierten Charakterisierung des Oberflächentransports und der biologischen Aktivität des KV-G Proteins werden in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

3.1 Heterotypische Fusionshelferaktivität des KV-G Proteins

Sind virale Proteine nah verwandter Viren funktionell und strukturell so ähnlich, dass sie sich gegenseitig ersetzen können, gehören die Viren in der Regel zum gleichen Virusgenus. Dies gilt auch für die beiden Henipavirus-Prototypen Nipah und Hendravirus. Werden die G- und F-Glykoproteine von HeV und NiV untereinander ausgetauscht, so führt deren Koexpression immer noch zur Henipavirus-typischen Zell-Zell-Fusion und zur Entstehung von Synzytien (Bossart *et al.*, 2002). Die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen bei der Koexpression von KV-G und NiV-F ist somit neben der Sequenzhomologie in der Virus-Polymerase L (Drexler *et al.*, 2012) ein funktioneller Beweis dafür, dass KV dem Genus Henipavirus zugeordnet werden kann.

Der Vergleich der Synzytiengröße in Zellen, die KV-G und NiV-F bzw. NiV-G und NiV-F exprimieren (14 Kerne im Vergleich zu über 50 Kerne; vgl. Abb. 2.1) zeigte allerdings einen deutlichen Funktionshelferdefekt des KV-G Proteins. Im Vergleich zum KV-G scheint das zweite KV Glykoprotein, das KV-F, noch größere funktionelle Defekte aufzuweisen. Frühere Beobachtungen hatten gezeigt, dass KV-F mit KV-G oder mit NiV-G nur in ganz wenigen Zelltypen sehr kleine Synzytien induzieren kann (Krüger *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2014, Lawrence *et al.*, 2014). Trotz einer umfangreichen

Mutationsanalyse konnte die biologische Aktivität des KV-F proteins bisher noch nicht wiederhergestellt werden (Weis, Behner *et al.*, 2014; Weis, Behner *et al.*, 2015; Dissertation Michael Weis, 2014).

3.2 Ineffizienter Oberflächentransport des KV-G Proteins

Mittels Oberflächenbiotinylierung und quantitativer FACS-Analyse konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Oberflächenexpression des KV-G Proteins im Vergleich zum NiV-G Protein sehr gering ist (vgl. Abb. 2.2 und 2.3). Die verminderte Oberflächenexpression ist nicht auf eine insgesamt schwächere Expression des KV-G Proteins zurückzuführen, da beide Proteine ein vergleichbares intrazelluläres Expressionslevel aufweisen (vgl. Abb. 2.2). Eine Ursache für die geringe Oberflächenexpression ist viel mehr ein ineffizienter Oberflächentransport des KV-G Proteins. *Pulse Chase*-Analysen mit anschließender Endoglykosidase-Behandlung konnten diese Hypothese bestätigen. Hier zeigte sich der verzögerte Transport des KV-G Proteins vom ER zum Golgi-Apparat darin, dass zwei Stunden nach der radioaktiven Markierung weniger Endo H resistentes KV-G als NiV-G detektiert werden konnte (vgl. Abb. 2.6). Das bedeutet, dass KV-G innerhalb eines Zeitrahmens von zwei Stunden weniger effizient als NiV-G aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert wurde. Eine weitere Möglichkeit, einen verzögerten und ineffizienten ER-Export von KV-G nachzuweisen, wäre die Analyse der „*unfolded protein response*“ (UPR). Liegen im ER zu viele falsch gefaltete Proteine vor, so wird eine Stressreaktion ausgelöst. Dieser Situation kann die Zelle dann über verschiedene Signalkaskaden entgegenwirken, um das intrazelluläre Gleichgewicht wiederherzustellen (Schröder und Kaufman, 2005). Dafür werden beispielsweise verstärkt Chaperone exprimiert, die einerseits an der Faltung und andererseits an dem Abbau von falsch gefalteten Proteinen beteiligt sind (Walter und Buchner, 2002; Hetz, 2012). Ein verzögerter ER-Export und damit eine Akkumulation des KV-G Proteins im ER könnte eine solche Stressreaktion in Zellen hervorrufen, wie es beispielsweise für das NS2-Transmembranprotein des Hepatitis C Virus (HCV) gezeigt werden konnte (Von Dem Bussche *et al.*, 2010). Im Rahmen seiner Masterarbeit wurden von Julian Hüther in unserer Arbeitsgruppe bereits einige Vorversuche zur KV-G Protein induzierten UPR-Induktion durchgeführt. Erste Experimente zeigen eine deutliche Induktion der Stressantwort. Allerdings weisen Vergleichsstudien mit NiV-G darauf hin, dass bei der Einzelexpression des KV-G Proteins eher eine geringere Stressreaktion der Zellen zu beobachten ist, als bei der Expression des NiV-G Proteins, welches effizienter an die Oberfläche transportiert wird (Masterarbeit Julian Hüther, 2017). Bisher wurden diese

Versuche jedoch nur in sehr stress-resistenten Zelllinien durchgeführt und es bleibt weiterhin die Frage zu klären, ob eine ER-Retention des KV-G Proteins in primären humanen Zellen zu einer erhöhten Stressantwort führt.

3.3 N-Glykane sind essentiell für den Transport und die Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins

Durch ihre Position und Anzahl können N-Glykosylierungsstellen Einfluss auf Stabilität, Faltung oder Transporteigenschaften eines Proteins nehmen (Parodi, 2000; Shental-Bechor & Levy, 2008). Das KV-G Protein besitzt sechs N-Glykane (vgl. Abb. 2.9) und unterscheidet sich somit nicht in der Anzahl von tatsächlich benutzten N-Glykosylierungsstellen im Vergleich mit HeV-G oder NiV-G (Biering *et al.*, 2012; Bradel-Trethaway *et al.*, 2015). Allerdings ist die Anzahl an potentiellen N-Glykosylierungsstellen im KV-G mit neun im Vergleich zu sieben oder acht bei NiV-G bzw. HeV-G leicht erhöht. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurden an vier der sieben potentiellen N-Glykosylierungsstellen der KV-G Kopfdomäne N-Glykane (N207, N255, N327 und N396) postuliert. Diese entsprechen den Positionen G3, G5, G7 und G9. An den verbliebenen drei Stellen (N224, N324 und N350) konnten keine eindeutigen Elektronendichten nachgewiesen werden, woraus die Autoren folgerten, dass hier wahrscheinlich keine N-Glykane gebunden sind (Lee *et al.*, 2015). Diese Beobachtungen stimmen nur teilweise mit denen in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen überein. Hier ergab die Charakterisierung der Glykosylierungsmutanten, dass das KV-G Protein an den Stellen G1, G2, G3, G4, G5 und G9 glykosyliert wird (vgl. Abb. 2.9). Diese abweichenden Resultate können auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die N-Glykosylierung des gesamten Proteins durch einen Aminosäureaustausch des jeweiligen Asparagins in der Konsensussequenz N-X-S/T zu Glutamin verhindert und anhand eines Laufhöhenunterschieds durch die fehlenden Zuckerketten in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Lee und Kollegen verwendeten für ihre Kristallisations-Studien eine durch Endo H Behandlung teilweise deglykosylierte sekretierte Form der KV-G Kopfdomäne, welche mit der Bindedomäne des henipaviralen Rezeptors Ephrin-B2 koexprimiert wurde (Lee *et al.*, 2015). Der Vorteil der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode besteht darin, dass das vollständige Protein untersucht wurde. Dabei konnten nicht nur in der Kopfdomäne, sondern auch in der Stieldomäne die tatsächlich genutzten N-Glykosylierungsstellen bestimmt werden. Außerdem wurde durch die eingefügte Mutation die Glykosylierung

an der jeweiligen Stelle komplett verhindert, sodass das fehlende Glykan eindeutig über einen Laufhöhenunterschied identifiziert werden konnte und nicht wie bei Lee *et al.* (2015) über Elektronendichte-Unterschiede geschlossen wurde.

Die Charakterisierung der Glykosylierungsmutanten des KV-G Proteins, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte, dass die Aktivität des Proteins negativ beeinflusst wird, sobald eines der N-Glykane entfernt wurde (vgl. Abb. 2.11). Die Mutante $\Delta G5$ wies den geringsten negativen Effekt in Bezug auf die Synzytienbildung auf (vgl. Abb. 2.11B), sodass G5 wahrscheinlich nur einen geringfügigen Einfluss auf die Funktion des KV-G Proteins hat. Dieses Ergebnis stimmt mit den Studien von Lee und Kollegen (2015) überein. Hier zeigte eine ähnliche Mutation an gleicher Stelle (N224D anstatt N224Q) auch keinen negativen Einfluss auf die Fusionshelferaktivität im Vergleich zum Wildtyp KV-G Protein in U87-Zellen (humane Glioblastomzellen) (Lee *et al.*, 2015).

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass zwei der verwendeten Glykosylierungsstellen in der Stieldomäne des KV-G Proteins liegen (vgl. G1 und G2 in Abb. 2.9). Während G1 (N102) nahe der Transmembrandomäne lokalisiert ist, befindet sich G2 (N177) genau zwischen den für die Oligomerisierung wichtigen Cysteinen C2 und C3 (vgl. C174 und C178 in Abb. 2.12). Liu und Kollegen (2015) konnten für NiV-G zeigen, dass das Entfernen des N-Glykans G2, welches ebenfalls zwischen den Cysteinen C2 und C3 positioniert ist, die Bildung von Tetrameren verstärkt und die Bildung von Dimeren verringert. Daraus wurde geschlossen, dass diese Mutante eine erhöhte oligomere Stabilität besitzt und die N-Glykosylierung an dieser Position im NiV-G Wildtypprotein für die Stabilität der Dimere verantwortlich ist, in dem es eine vermehrte Tetramerbildung verhindert (Liu *et al.*, 2015). Auf Grund der Tatsache, dass das wildtypische KV-G Protein bereits fast ausschließlich in tetrameren Formen exprimiert wird, hatte das Entfernen des N-Glykans an Position G2 keinen Einfluss auf die Stabilität der oligomeren Formen. Das Verhältnis von Dimeren und Tetrameren konnte durch die Mutation nicht verändert werden (eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt).

3.4 KV-G bildet verstärkt hocholigomere Formen aus

Das NiV-G Protein besitzt in seiner Stieldomäne drei Cysteine, die für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich sind (Maar *et al.*, 2012). Dabei bilden zwei kovalent verbundene Monomere über eine doppelte Disulfidbrücke zwischen C158 und C162 ein Dimer aus. Zwei solcher Dimere formen über eine nicht-kovalente Bindung an C146 ein stabiles Tetramer. Fehlt eines der Cysteine an Position 158 oder

162, so liegt das Protein ausschließlich in monomerer Form vor. Daraus kann geschlossen werden, dass die Dimerisierung über C158 und C162 für die Bildung von höheren Oligomeren essentiell ist (dargestellt in der Einleitung Abb. 1.10). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Oligomerisierung des KV-G Proteins diesem Modell nicht folgt und es sich somit signifikant vom NiV-G Protein unterscheidet. Eine erste wichtige Beobachtung war, dass der Anteil an dimeren Formen des KV-G Proteins unter nicht reduzierenden Bedingungen kaum nachzuweisen ist, während das Dimer-Tetramer-Verhältnis bei NiV-G 1:1 entspricht (vgl. Abb. 2.12). Vergleichbare Ergebnisse zeigten auch eine Analyse mittels nativer Gelelektrophorese (*native PAGE*, durchgeführt von Marc Ringel, Daten unveröffentlicht) und auch die in dieser Arbeit gezeigte *Pulse Chase*-Analyse (vgl. Abb. 2.13). Hier konnten sowohl direkt (0 h) als auch 2 h nach der radioaktiven Markierung der G-Proteine kaum KV-G Dimere nachgewiesen werden. Alle Untersuchungen deuten somit daraufhin, dass die Bildung von höheren Oligomeren bei KV-G schneller als bei NiV-G stattfindet. Der Zwischenschritt der Dimerbildung wird „übersprungen“ und Tetramere werden schneller gebildet. Vergleichbar zu KV-G zeigt auch das G-Protein des kürzlich entdeckten Mojiang Henipavirus eine verstärkte Bildung von hocholigomeren Formen (Rissanen *et al.*, 2017).

Das Expressionsmuster der verschiedenen Cystein-Stieldomänen-Mutanten von KV-G (vgl. Abb. 2.16, obere Spalte) konnte bestätigen, dass wie bei NiV-G auch bei KV-G drei Cysteine in der Stieldomäne für die Oligomerisierung verantwortlich sind, diese jedoch deutlich anders strukturiert ist. Hier können über eine einfache Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen Dimere gebildet werden, wobei es nicht relevant ist, welches der drei Cysteine die Disulfidbrücke bildet. Zur Generierung von Tetrameren müssen lediglich C1 und ein weiteres Cystein in der Stieldomäne vorhanden sein. Diese Unterschiede im Ablauf der Oligomerisierung deuten stark darauf hin, dass es strukturelle Abweichungen im KV-G Protein im Vergleich zu NiV-G gibt. Diese könnten eine schnelle ko-translationale intermolekulare Disulfidbrückenbildung in noch nicht fertiggestellten Proteinen ermöglichen. Das könnte dazu führen, dass Proteine kürzer mit ER-Chaperonen interagieren und eine Aggregation der Proteine eingeleitet wird. Die Hypothese, dass das KV-G Protein schneller als NiV-G abgebaut wird, konnte jedoch nicht bestätigt werden, da vergleichbare intrazelluläre Proteinmengen detektiert werden konnten (vgl. Abb. 2.2). Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass die strukturellen Eigenschaften des KV-G Proteins eine ko-translationale Bildung von nicht-nativen Disulfidbrücken fördert. Diese Disulfidbrücken müssten zunächst umstrukturiert (*reshuffled*) werden, um anschließend die korrekte Dimerisierung/Oligomerisierung zu

ermöglichen. Durch diesen Prozess wären die KV-G Proteine länger mit den dafür verantwortlichen Protein Disulfid Isomerasen (PDI) in Kontakt, was den Transport aus dem ER verlangsamen könnte. Solche *reshuffling*-Prozesse wurden zum Beispiel für den LDL-Rezeptor beschrieben. Dieses Protein, welches 30 native Disulfidbrücken besitzt, benötigt zuvor die Bildung von nicht-nativen Disulfidbrücken, die umgestaltet werden müssen, um letztendlich die korrekte Faltung des Proteins zu erhalten (Jansens *et al.*, 2002).

Neben den drei Cysteinen in der Stieldomäne stellen die Propellerblätter $\beta 1$ und $\beta 6$ der globulären Kopfdomäne im NiV-G Protein mögliche Oligomerisierungsbereiche dar (Bowden *et al.*, 2008). Ein Aminosäuresequenz-Vergleich mit KV-G zeigt, dass in dem Bereich des $\beta 1$ -Faltblatts eine potentielle N-Glykosylierungsstelle G5 (N255) liegt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Stelle auch tatsächlich glykosyliert wird (vgl. Abb. 2.8). Unter der Annahme, dass die Propellerblätter $\beta 1$ und $\beta 6$ im KV-G ebenfalls Oligomerisierungsbereiche darstellen, könnte die Glykosylierung die Interaktion zweier KV-G Proteine beeinträchtigen. Durch die angefügten Zuckerketten kann sich die Konformation der globulären Kopfdomäne verändern, was wiederum dazu führen könnte, dass die Dimerisierung der Proteine benachteiligt oder erschwert werden würde. Unsere bisherigen Analysen zur Oligomerisierung der $\Delta G5$ Mutante zeigten jedoch keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp KV-G Protein (eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt). Möglicherweise liegt in den Bereichen der Propellerblätter anders als beim NiV-G Protein keine Interaktionsdomäne vor, oder G5 hat einen vernachlässigbaren Einfluss.

3.5 Veränderungen im Oligomerisierungsmuster führen zum Verlust der Fusionshelferfunktion

In Koexpression mit NiV-F vermittelte keine der Cystein-Stieldomänen-Mutanten des KV-G Proteins Zell-Zell-Fusion (vgl. Abb. 2.17). Alle Mutanten scheinen einen Defekt in der Fusionshelferaktivität zu haben, selbst wenn ihre oligomeren Expressionsformen der des NiV-G Proteins (Dimer-Tetramer-Verhältnis 1:1) entsprechen (vgl. Abb. 2.16 ^{mut}C2 und ^{mut}C3 in Spur 3 und 4). Daraus lässt sich schließen, dass jegliche Veränderung in der Oligomerisierung von KV-G die biologische Aktivität des Proteins noch stärker vermindert. Auf Grund der Tatsache, dass Immunfluoreszenz-Analysen zeigen konnten, dass alle an der Oberfläche exprimierten Mutanten noch mit Ephrin-B2 interagieren können (vgl. Abb. 2.18), kann vermutet werden, dass entweder die F-G-Interaktion oder die Aktivierung des F-Proteins die Fusion einzuleiten, das sogenannte

F-triggering, gestört ist. Diese Vermutung basiert auf Ähnlichkeiten zu NiV-G. Auch hier führte der Austausch der Cysteine in der Stielregion zum Verlust der Fusionshelferfunktion (Maar *et al.*, 2012), obwohl eine funktionelle Bindung an Ephrin-B2 und eine effiziente Interaktion der Mutanten mit NiV-F nachgewiesen werden konnte. Für NiV-G wurde deshalb vermutet, dass die Lage und das Vorhandensein der Cysteine in der Stielregion eine essentielle Voraussetzung für das *F-triggering* und somit für die Einleitung der Zell-Zell-Fusion sind. Für andere paramyxovirale Glykoproteine scheinen Cysteine in der Stieldomäne des Rezeptor-bindenden Proteins nicht absolut essentiell für die Fusionshelferfunktion zu sein. Das H-Protein des Masernvirus (MV), in dem Cysteine durch Serine in der Stielregion ausgetauscht werden, weist lediglich eine reduzierte Fusionshelferfunktion auf (Plempner *et al.*, 2011).

3.6 Ein nicht konserviertes Endozytose-Motiv Y₃₈FGL verringert die Oberflächenexpression des KV-G Proteins

NiV und HeV F-Proteine müssen durch das Recycling-Endosom transportiert werden, um von den wirtszelleigenen Proteasen Cathepsin L und B gespalten zu werden. Dieser Prozess findet erst statt, nachdem das inaktive Vorläuferprotein F₀ an die Zelloberfläche transportiert wurde. Um anschließend wieder internalisiert zu werden, besitzen die NiV und HeV F-Proteine in ihrer zytoplasmatischen Domäne ein funktionelles YxxΦ Endozytose-Motiv (Diederich *et al.*, 2005 und 2012; Pager *et al.*, 2005 und 2006). Im Gegensatz zu den F-Proteinen werden henipavirale G-Proteine nicht endozytiert, sondern konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert (Vogt *et al.*, 2005). Umso interessanter war die Beobachtung, dass KV-G ein nicht konserviertes Endozytose-Motiv Y₃₈FGL in der zytoplasmatischen Domäne besitzt (vgl. Abb. 2.19), welches funktionell ist (vgl. Abb. 2.20). Das bedeutet, dass neben dem verzögerten ER-Export die Oberflächenexpression des KV-G Proteins durch konstitutive Endozytose zusätzlich verringert wird. Aber obwohl die erzeugte Endozytose-Mutante KV-G_{Y38A} eine erhöhte konstitutive Oberflächenexpression aufwies (vgl. Abb. 2.24), war ihre Fusionshelferaktivität nicht verstärkt (vgl. Abb. 2.25). Auf Grund dieser Tatsache muss davon ausgegangen werden, dass die erzielte Steigerung noch zu gering ist, um den Defekt in der Fusionshelferaktivität nachweislich zu verbessern.

3.7 Die Kombination aus den Mutationen C314S und Y38A steigert die Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins signifikant

Während die Zahl der Cysteine in der Stieldomäne von NiV-G und KV-G identisch ist, unterscheidet sie sich in der globulären Kopfdomäne. In der Kopfdomäne des KV-G Proteins liegen drei nicht konservierte Cysteine vor: C314, C378 und C422. Lee und Kollegen (2015) postulierten, dass KV-G in der globulären Kopfdomäne acht Disulfidbrücken besitzt, während es bei NiV-G lediglich sieben sind. Die nicht konservierte intramolekulare Disulfidbrücke im KV-G Protein wird vermutlich zwischen C378 und C422 ausgebildet und ist für die Stabilität des dritten Faltblattes des β -Propellers verantwortlich (Lee *et al.*, 2015). Übereinstimmend mit der Vermutung, dass diese beiden Cysteine für die Konformation wichtig sind, konnte Louisa Zimmermann zeigen, dass die Proteinexpression durch Mutation von C378 oder C422 stark herunterreguliert wird (Bachelorarbeit Louisa Zimmermann, 2015). Für das dritte nicht konservierte Cystein (C314) vermuteten Lee und Kollegen, dass dieses ungepaart vorliegt und aber auch für die korrekte Faltung des Proteins entscheidend ist. Eine Cystein zu Alanin-Mutation führte zwar zu keiner signifikanten Veränderung in der Oberflächenexpression oder Ephrin-B2 Bindung; ein Austausch zu Methionin hingegen verringerte jedoch die Oberflächenexpression (Lee *et al.*, 2015). Auch der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Austausch des C314 zu Serin zeigte einen Effekt; er beeinflusste zwar nicht die Oberflächenexpression, steigerte jedoch signifikant die Fusionshelferfunktion (*gain of function*) des KV-G Proteins (vgl. Abb. 2.26). Im Gegensatz zu Methionin ist Serin, genau wie das im KV-G Wildtyp vorkommende Cystein, eine polare und neutrale Aminosäure, was vermuten lässt, dass die Expression und Fusionshelferfunktion des KV-G Proteins von der Ladung und der Polarität der Aminosäure an dieser Position stark abhängig ist. Da C314 nicht in räumlicher Nähe zur Ephrin-B2-Bindestelle liegt, kann davon ausgegangen werden, dass in der *gain of function*-Mutante KV-G_{C314S} die Interaktion mit Ephrin-B2 nicht direkt beeinflusst wird. Da keine signifikant erhöhte Oberflächenexpression festgestellt werden konnte, könnte vielleicht die G-F Interaktion positiv beeinflusst sein. Die müsste man aber beispielsweise durch Co-Immunpräzipitations-Analysen mit NiV-F noch bestätigen.

Da die Mutation C314S die Fusionshelferfunktion verbesserte und die Mutante KV-G_{Y38A} eine erhöhte Oberflächenexpression aufwies, wurde eine Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} erzeugt. Hierdurch konnte die Fusionshelferfunktion nochmals weiter signifikant gesteigert werden (vgl. Abb. 2.27), obwohl die Mutation im Endozytose-Motiv alleine keine Verbesserung der Funktionshelferfunktion gezeigt hatte. Daraus

lässt sich schließen, dass die Mutation an der Position Y38 zur Steigerung der Funktion beiträgt, wenn sie mit einer anderen *gain of function*-Mutante kombiniert wird.

3.8 Charakterisierung der Funktion des KV-G Proteins im viralen Kontext

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur funktionellen Charakterisierung des KV-G Proteins ergaben, dass das Glykoprotein zwar prinzipiell funktionell ist, im Vergleich zum NiV-G Protein jedoch eine deutlich geringere Fusionshelferaktivität aufweist. Dies ist hauptsächlich auf einen ineffizienten Oberflächentransport zurückzuführen. Diese Defekte können durch das Einfügen zweier Punktmutationen in der zytoplasmatischen Domäne und der globulären Kopfdomäne teilweise überwunden werden. Allerdings stammen alle bisherigen Beobachtungen aus Versuchen, bei denen das KV-G Protein transient in Zellen exprimiert wurde. Dies erlaubt natürlich keine generelle Aussage darüber, wie funktionell das KV-G Protein im Rahmen einer vollen Virusinfektion wäre und darüber, welche Säugerzellen für eine Infektion mit replikationsfähigem KV empfänglich wären. Damit ist es leider noch nicht möglich die Frage zu beantworten, inwieweit afrikanische Henipaviren wie KV außerhalb von Flughunden replizieren und sich bei eventueller Übertragung in einer anderen Säugerspezies ausbreiten könnten. Aus diesem Grund müsste als nächstes die Funktionalität des KV-G Proteins im viralen Kontext geklärt werden und die Frage beantwortet werden, inwieweit einzelne Punktmutationen im KV-G die biologische Aktivität und die Infektionsausbreitung verbessern oder verschlechtern können. Hierzu müsste ein rekombinantes KV mittels reverser Genetik erstellt werden. Da alle bisherigen Versuche der Virusanzucht oder der Isolierung von replizierenden KV aus Flughunden erfolglos blieben (Drexler *et al.*, 2009), aber im heterotypischen Fusionsassay bereits gezeigt werden konnte, dass das KV-G mit dem NiV-F Protein interagieren kann und funktionell aktiv ist (Weis, Behner *et al.*, 2014), sollte es möglich sein, rekombinante chimäre Viren aus KV und NiV zu generieren, wie es auch für HeV und NiV bereits erfolgreich gelungen ist (Yun *et al.*, 2015). Mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe etablierten reverse-Genetik-Systems für NiV (Dietzel *et al.*, 2015) könnten unter BSL-4 Bedingungen solche rekombinanten KV-NiV-Chimären erstellt werden. Dabei müsste das G-Gen im NiV-Genom durch das KV-G Gen ausgetauscht werden. Mit einem solchen KV-G tragenden NiV können im ersten Schritt verschiedene humane, porcine oder Flughundzelllinien infiziert und auf zytopathische Effekte hin untersucht werden. Auf diese Weise könnte festgestellt werden, ob KV-G auch im

Gesamt-Viruskontext mit NiV-F interagieren kann, d. h. ob es einen Viruseintritt in Wirtszellen und die Fusion virusinfizierter Zellen mit Nachbarzellen vermitteln kann. Die Virusreplikation, die Virusausbreitung im Zellverband sowie die Freisetzung viraler (infektiöser) Partikel müsste dabei mit wildtypischem NiV verglichen werden. Aufgrund der bisher beobachteten verminderten Oberflächenexpression und reduzierten Fusionshelferfunktion kann davon ausgegangen werden, dass dieses chimäre NiV mit einem KV-G Protein deutlich weniger infektiös als das wildtypische rNiV ist. Der bereits beobachtete ineffiziente Transport der viralen Oberflächen-Glykoproteine wird vermutlich sowohl die Zell-Zell-Fusion als auch die Virusfreisetzung massiv herunterregulieren, sodass sich das Virus wahrscheinlich nicht effizient ausbreiten und vermehren kann. Interessant wäre es im Vergleich eine NiV-KV-Chimäre zu analysieren, die statt dem Wildtyp KV-G die Doppelmutante KV-G_{Y38A+C314S} enthält. Hiermit könnte die Frage geklärt werden, ob der Effekt der gesteigerten Fusionshelferfunktion, der in transfizierten Zellen beobachtet werden konnte, auch im viralen System zu detektieren ist.

3.9 Identifikation neuer Henipaviren

Bis vor einigen Jahren ist man davon ausgegangen, dass die Ausbreitung von Henipaviren auf den südostasiatischen Raum und Australien begrenzt ist. Diese Hypothese basierte auf der geographischen Verteilung der Flughunde der Gattung *Pteropus*, welche als einziger natürlicher Wirt für Henipaviren bekannt waren (Hayman *et al.*, 2008). Jedoch konnte diese Theorie in den letzten Jahren widerlegt werden: So konnten beispielsweise in Madagaskar in drei verschiedenen Flughundspezies (*Eidolon dupreanum*, *Pteropus rufus* und *Rousettus madagascariensis*) Antikörper gegen Henipaviren detektiert werden (Iehlé *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Flughunde, die nicht zur Gattung *Pteropus* gehören, Kontakt zu Viren der Familie Paramyxoviridae, insbesondere zu Henipavirus-ähnlichen Viren hatten. 2,3 % der Serumproben von *P. rufus* und 19,2 % von *E. dupreanum* wiesen kreuzreaktive Antikörper auf (Iehlé *et al.*, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass Flughunde der Gattung *Eidolon* im gesamten Gebiet südlich der Sahara verbreitet und auch sehr mobil sind (sie können bis zu 2500 km pro Jahr fliegen (Richter und Cumming, 2008)), wurde die Vermutung aufgestellt, dass Henipaviren auch in anderen Gebieten des afrikanischen Festlands vorkommen. Tatsächlich wurden kurze Zeit später Antikörper gegen Henipaviren in *E. helvum* Flughunden sowohl in Ghana in Westafrika (Hayman *et al.*, 2008) als auch auf der Insel Annobón im Golf von Guinea (Peel *et al.*, 2012) detektiert. Des Weiteren konnten

in der Republik Kongo Henipavirus-ähnliche RNA-Sequenzen in *E. helvum* Flughunden, die hier als sogenanntes *bushmeat* der Bevölkerung zum Verzehr dienen, nachgewiesen werden (Weiss *et al.*, 2012).

Es wird vermutet, dass es zwei unterschiedliche Möglichkeiten gibt, wie Menschen mit bislang unbekannten Viren in Afrika in Kontakt kommen können: zum einen direkt durch das Jagen von Flughunden und den anschließenden Verzehr des sogenannten *bushmeat*, zum anderen indirekt durch Kontamination von Nahrungsmitteln durch Ausscheidungen infizierter Flughunde. Letzteres ist seit vielen Jahren der Hauptübertragungsweg von NiV-Infektionen in Bangladesch, wo es durch den Verzehr von kontaminiertem, rohem Palmsaft, regelmäßig zu kleineren NiV-Ausbrüchen kommt (Luby *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Auch bei dem ersten NiV-Ausbruch in Malaysia basierten die ersten Infektionen von Schweinen auf dem Verzehr von Baumfrüchten, die mit Flughund-Ausscheidungen kontaminiert waren (Wong *et al.*, 2002). Schweine verbreiteten damals die Infektion innerhalb der Schweinepopulation sehr rasch und dienten als Zwischenwirt für NiV-Infektionen von über 200 Menschen (Field *et al.*, 2001). Damit ist klar, dass auch in Afrika nicht nur für Menschen die Gefahr einer Infektion mit bislang unbekannten Henipaviren besteht. Tatsächlich wurden bereits (nicht-neutralisierende) Antikörper in Schweinepopulationen in Ghana nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass diese Tiere bereits in Kontakt mit afrikanischen Henipaviren standen (Hayman *et al.*, 2011). Obwohl die aktuellen Untersuchungen zeigen, dass Henipaviren großflächig in afrikanischen Flughunden verbreitet sind, gibt es dort bis heute weder dokumentierte Fälle von Henipavirus-Infektionen beim Menschen, noch eine auffällig erhöhte Anzahl an Todesfällen von beispielsweise Flughund-Jägern (Weiss *et al.*, 2012). Trotzdem kann das Auftreten von einzelnen Fällen nicht ausgeschlossen werden. Durch die lückenhafte Gesundheitsversorgung könnte es nicht dokumentierte Krankheitsfälle geben oder eine Henipavirus-Infektion wurde fehldiagnostiziert, beispielsweise als Malaria, Typhus oder Gelbfieber; Infektionskrankheiten, die in diesen Regionen stark verbreitet sind (Weiss *et al.*, 2012; Pernet *et al.*, 2014). Hier sei anzumerken, dass auch der erste NiV-Ausbruch 1998 in Malaysia zunächst als Japanische Enzephalitis fehldiagnostiziert wurde (Chua *et al.*, 1999). Und hätte es nicht so große Fallzahlen gegeben, wäre die Fehldiagnose und der Zusammenhang mit den Infektionen in den Schweinen wahrscheinlich auch nie erkannt worden. Auch ein NiV-Ausbruch in Indien wurde anfangs als „anormale Masernerkrankung“ beschrieben (Chadha *et al.*, 2006).

Möglicherweise gibt es aber auch gar keine Infektionen mit afrikanischen Henipaviren, weil diese gar nicht humanpathogen sind, wie beispielsweise das kürzlich entdeckte

Cedarvirus (CedV). Dieses wurde im Jahr 2012 aus australischen Flughunden isoliert. Da es eine mit NiV und HeV vergleichbare Genomgröße und Anordnung zeigte, hohe Sequenzhomologien in der Viruspolymerase aufwies und das Glykoprotein G ebenfalls an Ephrin-B2 binden konnte, wurde es dem Genus Henipavirus zugeordnet. Im Unterschied zu den pathogenen Henipaviren NiV und HeV scheint bei CedV kein RNA-Editing im P-Gen stattzufinden, sodass das V-Protein, welches bei NiV oder HeV als Interferon-Antagonist fungiert, nicht exprimiert wird (Marsh *et al.*, 2012). Somit kann CedV der Interferon-induzierten antiviralen Aktivität nicht entgegenwirken. Dies ist sehr wahrscheinlich der Hauptgrund für die fehlende Humanpathogenität des CedV.

Neben CedV wurde vor kurzem in China ein weiteres neues Henipavirus, Mojiang Paramyxovirus (MojV), identifiziert. Es hatte mehrere Minenarbeiter infiziert, die an einer Lungenentzündung verstarben (Wu *et al.*, 2014). Aufgrund hoher Sequenzübereinstimmungen in der Polymerase L wurde es wie CedV und KV kürzlich offiziell dem Genus Henipavirus zugeordnet (Afonso *et al.*, 2016). Besonders interessant ist hierbei, dass bei diesem Henipavirus nicht Flughunde, sondern Ratten der Spezies *Rattus flavipectus* als natürlicher Wirt dienen. Sowohl Gewebeproben, als auch Ausscheidungen von *R. flavipectus* konnten mittels spezifischer PCR positiv für MojV getestet werden. Wie KV konnte MojV auch noch nicht als replikationsfähiges Virus isoliert werden, so dass auch dessen zoonotisches Potential weitgehend unbekannt ist (Wu *et al.*, 2014). Dennoch weist die Entdeckung von MojV darauf hin, dass möglicherweise mehr Säugetierarten als bisher vermutet mit Henipaviren infiziert werden können und dass Flughunde wahrscheinlich nicht die einzigen Reservoirs von Henipaviren darstellen.

3.10 Einschätzung des zoonotischen Potentials von KV

Alle Versuche, replizierendes afrikanisches Henipavirus KV zu isolieren blieben bisher erfolglos (Drexler *et al.*, 2009). Dies könnte methodisch bedingt sein, oder aber daran liegen, dass KV außerhalb von Flughunden nicht replikationsfähig ist. Letzteres könnte auf die geringe Oberflächenexpression und die geringe Aktivität der beiden Glykoproteine G und F zurückzuführen sein. Alle durchgeführten Expressionsstudien belegen eine stark eingeschränkte Funktionalität der beiden KV-Glykoproteine. Ein Virus mit solchen Glykoproteinen könnte wahrscheinlich keine produktive Infektion in Menschen oder anderen Säugetieren verursachen, da es sich vermutlich nur sehr ineffizient über Zell-Zell-Fusion oder über die Freisetzung viraler Partikel ausbreiten könnte. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein KV-G Protein mit

gesteigerter Aktivität, schon durch das Einfügen zweier Punktmutationen, entstehen kann. Somit muss in Betracht gezogen werden, dass afrikanische Henipaviren durch adaptive Mutation entstehen können oder bereits existieren, die eine gesteigerte Fusionshelferfunktion des Glykoproteins aufweisen und zur Infektion anderer Spezies fähig sind. Detaillierte Charakterisierungen der viralen Glykoproteine, wie sie in dieser Arbeit für das KV-G Protein durchgeführt wurden, sind daher von besonders großer Bedeutung. Nur durch vergleichende Analysen dieser neuen Proteine mit den bereits charakterisierten Proteinen bekannter (hochpathogener) Henipaviren ist es derzeit möglich, das humanpathologische Potential solcher neu entdeckten, bisher völlig unbekannten Viren abschätzen und bewerten zu können.

IV Material

4.1 Materialien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Acrylamid (Rotiphoese Gel 30 % Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose NA (ultra pure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2] Octan)	Merck, Darmstadt
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure (DOC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Didesoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
<i>Enlightning</i>	Dupont, Mechelen (Belgien)
Essigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol, abs. (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Madison (USA)
Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau)	Merck, Darmstadt

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
HEPES	
(Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kulturgefäße/-schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Mass Ruler™ DNA Ladder, Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>Medical X-Ray screen film blue sensitive</i>	Raymed, Imaging, Krauchthal
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Saliter, Obergünzburg
Mowiol 4-88	Calbiochem, San Diego (USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NeutrAvidin-Agarose Beads	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare, München
Objektträger, Kanten geschliffen (Menzel)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Prestained Protein Marker, <i>broad range</i>	NEB, Frankfurt a.M.

Promix [³⁵ S]-Methionin und -Cystein	Amersham, Braunschweig
Proteaseinhibitor-Mix (PI)	Calbiochem, San Diego (USA)
Protein A-Sepharose (Prot. A)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rekombinantes, lösliches Ephrin-B2/F _C	R&D Systems, Minneapolis, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin)	Biorad, München
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros, Geel (Belgien)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Whatman-Filterpapier	GE Healthcare, München

4.2 Enzyme

Endo H	NEB, Frankfurt a. M.
PNGase F	NEB, Frankfurt a. M.
SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)	Thermo Fisher Scientific, USA
Streptavidin-Peroxidase	GE Healthcare, München
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Velocity</i> DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde

4.2.1 Restriktionsendonukleasen

NheI HF (5'... G_CTAGC ... 3')	NEB, Frankfurt a. M.
NotI HF (5'...GC_GGCCGCG ...3')	NEB, Frankfurt a. M.
Pac1 (5' TTAAT_TAA 3')	NEB, Frankfurt a. M.
Sph1 (5' GCATG_C 3')	NEB, Frankfurt a. M.

Die entsprechenden Puffer wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.

4.3 Antikörper

4.3.1 Primärantikörper

anti-HA _{tag} (H6908)	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-HA _{tag}	Maus	Convance, Berkeley, USA
anti-FLAG	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-NiV-Serum (gp3)	Meerschw.	Dr. H. Weingartl und Dr. M. Czub, Winnipeg, Kanada

4.3.2 Sekundärantikörper

anti-Maus IgG/IRDye 800	Esel	Rockland, Gilbertsville (USA)
anti-Maus IgG/Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Oregon (USA)
anti-Maus IgG/Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, Oregon (USA)
anti-rabbit IgG/Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Oregon (USA)
anti-Meerschweinchen IgG/ Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Oregon (USA)
anti-Meerschweinchen IgG/ Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, Oregon (USA)
anti-Maus IgG/biotinyliert	Schaf	GE Healthcare, München
anti-Maus IgG/FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-human IgG/FITC	Kaninchen	DAKO-Agilent, Santa Clara (USA)
anti-Maus IgG/HRP	Kaninchen	DAKO-Agilent, Santa Clara (USA)
anti-Meerschweinchen IgG/HRP	Kaninchen	DAKO-Agilent, Santa Clara (USA)

4.4 Kits

E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I	Omega bio-tek, Norcross, USA
E.Z.N.A. Plasmid DNA Maxi Kit	Omega bio-tek, Norcross, USA
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Q5 <i>Site-Directed</i> Mutagenesis Kit	NEB, Frankfurt a.M.

Die Komponenten der Kits und die Zusammensetzung der jeweils enthaltenen Lösungen können den entsprechenden Firmenprotokollen entnommen werden.

4.5 Plasmide

pCG_MCS	AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_KV-G _{HA}	Michael Weis, AG Maisner, Institut für Virologie
pCAGGS_KV-G _{2xFLAG}	Michael Weis, AG Maisner, Institut für Virologie
pCAGGS_KV-F _{HA}	Michael Weis, AG Maisner, Institut für Virologie
pCAGGS_KV-F _{2xFLAG}	Michael Weis, AG Maisner, Institut für Virologie
pCAGGS_NiV-F _{HA}	Eva Haller, AG Maisner, Institut für Virologie
pCAGGS_NiV-G _{HA nichtcodonopt.}	Boris Lamp, AG Maisner, Institut für Virologie
pczCFG5_NiV-G _{HA nichtcodonopt.}	Dr. M. Moll, Institut für Virologie, Marburg
pCG_NiV-G _{HA nichtcodonoptimiert}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{HA}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{Y38A}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{Y38A+C314S}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{mutC1+C2}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{mutC2+C3}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{mutC1+C3}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{mutC1+C2+C3}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pCG_KV-G _{C314S}	Louisa Zimmermann, AG Mainser, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{mutC1}	Louisa Zimmermann, AG Mainser, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{mutC2}	Louisa Zimmermann, AG Mainser, Institut für Virologie

pCG_KV-G _{mutC3}	Louisa Zimmermann, AG Mainser, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG1}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG2}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG3}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG4}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG5}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG5}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG6}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG7}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG8}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pCG_KV-G _{ΔG9}	Kevin Wittwer, AG Maisner, Institut für Virologie
pDsRed2_ER	Clontech, USA

4.6 Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg hergestellt.

4.6.1 Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz
pCG_MCS_for	5' CATGTTTCATGCCTTCTTC 3'
pCG_MCS_rev	5' CCAACACACTATTGCAATG 3'
NiVG_seq_for	5' CCGGGGGCACAACCTGGCTTCTGAGGA 3'
NiVG_seq_rev	5' CCGGCCGGTATATTCATCACTATGATCA CG 3'

4.6.2 Klonierungsprimer

for_KV-G _{HA} _pac1	5' CCGGTTAATTAACACAATGCCGCAGAAGACT GTGG 3'
rev_KV-G _{HA} _sph1	5' CCGGGCATGCTGATTACTTATCGTCATCGT

CC TTGT 3'

for_NiV-G_{HA}_not1 5' CCGGGCGGCCGCCACCATGCCGGCAGAA
AA3'

rev_NiV-G_{HA}_nhe1 5' GCCGCTAGCTTTTTTAAGCGTAATCCGG
GACG TCGTACGGATATGTACAT 3'

for_NiV-G_{HA}_pac1 5' GCCTTAATTAAGCCGCCACCATGCCGG 3'

rev_NiV-G_{HA}_sph1 5' GGCCGCATGCTTTTTTAAGCGTAATCCG
GGA 3'

4.6.3 Q5 Site-Directed-Mutageneseprimer

KV-G-C1+C2_for 5' CAACCAAAGAGCGAGTTCAAGACAC 3'

KV-G-C1+C2_rev 5' ATTGACGGCAATAATTCC 3'

KV-G-C1+C3_for 5' AAGAATAAACAGCACCCCACCACTAAAC 3'

KV-G-C1+C3_rev 5' GAGTCATTCAGGACAAGTG 3'

KV-G-C2+C3_for 5' AAGAATAAACAGCACCCCACCACTAAAC 3'

KV-G-C2+C3_rev 5' GAGTCATTCAGGACAAGTG 3'

KV-G-C1+C2+C3_for 5' CAACCAAAGAGCGAGTTCAAGACAC 3'

KV-G-C1+C2+C3_rev 5' ATTGACGGCAATAATTCC 3'

KV-G-ΔG1_for 5' ACTTACAAGCCAGATCACAGTCCTG 3'

KV-G-ΔG1_rev 5' TCTGCCATCCTTTGATTG 3'

KV-G-ΔG2_for 5' CTGCAGAATACAGTGTACCCAC 3'

KV-G-ΔG2_rev 5' TCATTCAGGACAAGTGTC 3'

KV-G-ΔG3_for 5' TCCCTGTAGACAGTTTTTCATCCGTACCTAC 3'

KV-G-ΔG3_rev 5' GAGGGCCCATGTGCAACC 3'

KV-G-ΔG4_for 5' AGGATTATACCAGAGAACAGCATTGG 3'

KV-G-ΔG4_rev 5' GGAATCCGATAATAGTAAATTG 3'

KV-G-ΔG5_for 5' ATATGATAAACAGTGCACCAGAGGATTC 3'

KV-G-ΔG5_rev 5' TCAGAGTGGACATAAGCAAATTTTG 3'

KV-G-ΔG6_for 5' GTACAAAGCACAGCTATCTAATAGCAC 3'

KV-G-ΔG6_rev 5' AAGGGATCTGAGGAGGTC 3'

KV-G-ΔG7_ <i>for</i>	5' AAATCTATCTCAGAGCACATTCCATTTG 3'
KV-G-ΔG7_ <i>rev</i>	5' GCTTTGTACAAGGGATCTG 3'
KV-G-ΔG8_ <i>for</i>	5' GCCTAGCTTTCAGCTTTCTACTG 3'
KV-G-ΔG8_ <i>rev</i>	5' ATTGAAACTATTTTCTCATCCTTG 3'
KV-G-ΔG9_ <i>for</i>	5' CAAAAAGTCACAGTGTTTCGCGAAC 3'
KV-G-ΔG9_ <i>rev</i>	5' CATAAAGGATGGGTGACTC 3'
KV-G _{Y38A} _ <i>for</i>	5' CAAGCAGGGGGCGTTTGGGTTAGG 3'
KV-G _{Y38A} _ <i>rev</i>	5' GTGATTTTAGATTGATTGAGGG 3'
KV-G _{Y38A+C314S} _ <i>for</i>	5' CAAGCAGGGGGCGTTTGGGTTAGG 3'
KV-G _{Y38A+C314S} _ <i>rev</i>	5' GTGATTTTAGATTGATTGAGGG 3'

4.7 Zellen

4.7.1 Eukaryotische Zellen

Vero76	Nierenepithelzelllinie einer afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Ceropithecus aethiops</i>)
MDCK II (<i>Madin Darby canine kidney</i>)	Nierenepithelzelllinie eines Cockerspaniels (<i>Canis familiaris</i>)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie

4.7.2 Prokaryotische Zellen

<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
--	------------------------

4.8 Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medium ohne Methionin und Cystein; „Mangelmedium“)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco BRL, Eggenstein

OptiMEM

Gibco BRL, Eggenstein

4.9 Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen

LB-Medium

10 g Pepton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 l dH₂O

autoklavieren

LB-Agar

3,75 g Bacto-Agar

ad 250 ml LB-Medium

autoklavieren

4.10 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine™ 2000 Reagent

Invitrogen, Karlsruhe

FuGENE® HD Transfection Reagent

Roche, Mannheim

4.11 Puffer

BPB-Probenpuffer (6x) für Agarosegele

0,25 % Bromphenolblau (BPB)

40 % Sucrose

in dH₂O

MESNA-Puffer

50 mM Tris, pH 8,5

100 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

PBS _{def} (<i>phosphate buffered saline deficient</i>)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l dH ₂ O
PBS ⁺⁺	0,1 g MgCl ₂ 0,13 g CaCl ₂ ad 1 l PBS _{def}
TBE-Puffer (10x)	121,2 g Tris 51,4 g Borsäure 3,7 g EDTA ad 1 l dH ₂ O
Tfb-Puffer 1	30 mM Calciumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin steril filtrieren
Tfb-Puffer 2	10 mM Na-Mops (pH 7) 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin steril filtrieren

2x SDS-Probenpuffer für SDS-PAGE	1,0 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 2,0 ml 10 % SDS 1,0 ml Glycerin 0,1 ml Bromphenolblau 0,4 ml dH ₂ O
10x Laufpuffer für SDS-Gele	10 g Na-Mops (pH 7) 30 g Tris 144 g Glycin ad 1 l dH ₂ O
Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Ethanol ad 1 l dH ₂ O
RIPA-Puffer (<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)	1 % Triton X-100 1 % DOC 0,1 % SDS 0,15 M NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM EDTA ad 100 ml dH ₂ O
FACS-Puffer	1 g BSA ad 100 ml PBS _{def}

Puffer für Oberflächenbiotinylierungen (1-4)

Puffer 1 (mit und ohne BSA)

20 mM Tris
150 mM NaCl
5mM EDTA
1 % Triton X-100
0,2 % BSA
dH₂O 50 ml

Puffer 2

20 mM Tris
150 mM NaCl
5 mM EDTA
0,5 % Triton X-100
0,1 % SDS
0,2 % BSA
dH₂O 50 ml

Puffer 3

20 mM Tris
500 mM
NaCl 0,5 % Triton X-100
0,2 % BSA
dH₂O 50 ml

Puffer 4

50 mM Tris
dH₂O 50 ml

4.12 Inhibitoren

Chlorpromazin

Sigma-Aldrich, Steinheim

4.13 Mowiol

Mowiol wird zum Eindeckeln der Präparate für Immunfluoreszenz benutzt.

2,4 g Mowiol 4-88

6 g Glycerin

6 ml dH₂O

2 ml 0,2 M Tris pH 8,5

über Nacht quellen lassen

Der Ansatz löst sich bei einer Temperatur von 50-60 °C unter ständigem Rühren. Anschließend wird er für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und mit DABCO (10 % w/v) versetzt. Das Mowiol kann nun aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

V Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Tfb- und Hitzeschocktransformation

Als Transformation wird die Aufnahme fremder, frei vorliegender DNA durch prokaryotische Zellen bezeichnet. Zellen, die in der Lage sind, frei vorliegende DNA aufzunehmen, werden als kompetente Zellen bezeichnet. Von Natur aus sind nur wenige Bakterien kompetent, jedoch ist es möglich, einige Bakterienstämme, wie auch den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stamm XL1-Blue, durch Behandlung mit Chemikalien (z.B. mit Tfb (*transformation buffer*)-Puffer) zur Aufnahme von fremder DNA zu befähigen (Chung *et al.*, 1989). Die Effizienz der DNA-Aufnahme lässt sich durch Hitzeeinwirkung, den sogenannten Hitzeschock, steigern. Für die anschließende Selektion erfolgreich transformierter Bakterien besitzen diese eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenzkassette.

Für die Tfb-Transformation wurden 5 ml LB-Medium mit 50 µl einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue angeimpft und auf einem Schüttler bei 200 rpm über Nacht (ü.N.) bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen, das Bakterienpellet wurde in 40 ml Tfb-Puffer 1 gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 8 min wurde das Bakterienpellet in 4 ml Tfb-Puffer 2 resuspendiert und in Aliquots à 100 µl bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für eine Transformation wurden diese *E. coli*-Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut, dann wurde 1 µg Plasmid-DNA zu der 100 µl Bakteriensuspension gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec sowie eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Da die erfolgreich transformierten Bakterien nun eine plasmidkodierte Ampicillin-Resistenz besaßen, wurden sie auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (1:1000) ausgestrichen. Nach dem Ausplattieren der Bakteriensuspension erfolgte eine Inkubation ü.N. bei 37 °C. Resistente Kolonien wurden zur Gewinnung von DNA einzeln in ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und bei 37 °C ü.N. schüttelnd bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend nach der Standardmethode isoliert (siehe Kap. 5.1.2).

Um Plasmide, die mit Hilfe des Q5 *Site-Directed* Mutagenese Kits mutiert wurden, zu transformieren, wurden die im Kit enthaltenen Bakterien C2987 (Aliquots à 50 µl, gelagert bei -80 °C) verwendet. Nachdem die Bakterien auf Eis aufgetaut waren, erfolgte die Zugabe von 5 µl des DNA-KLD-Mixes aus dem Mutagenese Kit. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock bei 42 °C erfolgte für 30 sec, bevor eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min durchgeführt wurde. Danach wurden 950 µl des im Kit enthaltenen SOC-Mediums zu den Bakterien gegeben, welche nun für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf eine ampicillinhaltige LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien konnten am Folgetag in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin aufgenommen und zur DNA-Präparation (siehe Kap. 5.1.2) weiterverwendet werden.

5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels E.Z.N.A Fast Filter Plasmid DNA Maxi Kit (Maxipräparation, für 200 ml Übernachtskultur) oder Plasmid DNA Mini Kit (Minipräparation, für 5 ml Übernachtskultur) von Omega bio-tek. Die Durchführung der Präparation erfolgte nach den Angaben der jeweiligen Kit-Hersteller. Das Grundprinzip der Kits basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien. Nach dem Aufschluss der Zellen erfolgt zunächst eine Neutralisation, dann werden Zellreste, Proteine sowie chromosomale DNA durch Zentrifugationsschritte oder Filtration herausgefällt. Die Plasmid-DNA bindet nun unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran. Die gebundene DNA wird nach zweimaligem Waschen in Elutionspuffer eluiert. Die Waschschritte dienen dazu, die Verunreinigung durch beispielsweise bakterielle Rückstände zu vermindern. Diese können bei einem späteren Einsatz der Plasmide wie Transfektionen (siehe Kap. 5.2.4 und 5.2.5) stören.

5.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

DNA, die in Wasser gelöst ist, absorbiert ultraviolettes Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Das Lambert-Beersche Gesetz besagt, dass zwischen der Absorption und der Konzentration des absorbierenden Stoffes in einem definierten Bereich ein linearer Zusammenhang besteht. Die Konzentration der eluierten DNA wurde somit bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) mit einem Photometer (NanoDrop) quantifiziert.

5.1.4 Präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Mit Hilfe bakterieller Enzyme, den sogenannten Restriktionsendonukleasen, kann DNA durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen zerstört werden. Restriktionsendonukleasen erkennen kurze, palindromische Sequenzen und spalten die DNA an diesen oder in der Nähe dieser Stellen. Dabei können an den DNA-Strängen zwei unterschiedliche Arten von Enden entstehen: überhängende (*sticky ends*) oder nicht überhängende Enden (*blunt ends*). Auf diese Weise kann doppelsträngige DNA in Fragmente mit einer definierten Länge geschnitten werden. Durch Auftrennung in einem Agarosegel ergibt sich dann ein charakteristisches Bandenmuster.

Ein präparativer Restriktionsverdau wird verwendet, um ein spezifisches Gen-Fragment (*Insert*) aus einem Expressionsvektor (Ausgangsplasmid) herauszuschneiden und diesen in einen anderen Expressionsvektor (Zielpasmid) einzuklonieren.

Für einen präparativen Restriktionsverdau des *Inserts* wurde folgender Ansatz genutzt:

50 µl Insert-DNA (aus der Gelextraktion (siehe Kap. 5.1.6))
3 µl Puffer
0,3 µl BSA
10 U Restriktionsenzym 1
10 U Restriktionsenzym 2
ad 60 µl dH₂O

Für die Linearisierung des Zielpasmids wurde der folgende Ansatz gewählt:

5 µg Plasmid-DNA
3 µl Puffer
0,3 µl BSA
10 U Restriktionsenzym 1

10 U Restriktionsenzym 2

ad 30 µl dH₂O

Die Ansätze wurden über Nacht bei der für das Restriktionsenzym geeigneten Reaktionstemperatur inkubiert. Anschließend wurde die verdaute DNA in 6x Probenpuffer aufgenommen und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kap. 5.1.5).

5.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Mit einer Elektrophorese im Agarosegel lassen sich DNA-Fragmente in einem angelegten Spannungsfeld ihrer Größe nach auftrennen. Agarose ist ein Polysaccharid aus Galaktose, welches aus der Rotalge *Gelidium* gewonnen werden kann. Wird Agarose in TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) erwärmt und anschließend abgekühlt, so bilden sich Quervernetzungen aus. Kleinere DNA-Fragmente können diese Quervernetzungen schneller durchlaufen als größere Fragmente. Dadurch wird eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe (Anzahl an Basenpaaren) ermöglicht. Da die Phosphatreste der DNA-Moleküle negativ geladen sind, wandern die DNA-Fragmente im angelegten Spannungsfeld von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀N₃Br), welches der Agarose zugesetzt wird, interkaliert in doppelsträngige DNA und kann durch Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 250$ bis 350 nm) im sichtbaren Bereich fluoreszieren. So kann das DNA-Fragment im Gel detektiert werden. Neben den DNA-Proben wird ein Größenmarker mit aufgetragen. Dieser ermöglicht durch sein bekanntes Bandenmuster, die Laufhöhe und somit die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen.

Die Agarose wurde 1 %ig in 0,5-fachem TBE-Puffer angesetzt und so lange aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach anschließendem Abkühlen auf Handwärme wurde die Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben und die verflüssigte Agarose in einen Gelschlitten gegossen, in den bereits ein Gelkamm für die Probenaschen eingesetzt war. Nach dem Erhärten des Gels wurde es mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5-fachem TBE-Puffer überschichtet. Nach vorsichtigem Entfernen des Kamms wurden die mit 6x Probenpuffer versetzten Proben sowie der Größenmarker in die Taschen pipettiert und eine Elektrophorese bei 120-150 V für 30-90 min durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele in einer Apparatur

(GelDoc, Bio-Rad) unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) fotografiert. Handelte es sich hierbei um ein präparatives Agarosegel eines Restriktionsverdaus, so wurden die DNA-Fragmente bei langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

5.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken (siehe Kap. 5.1.5) eines präparativen Restriktionsverdaus wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das Gelstück wurde zunächst, ausgehend von seinem Gewicht, in der 3-fachen Menge Puffer bei 50°C gelöst. Die DNA wurde dann unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran gebunden und mehrmals gewaschen, bevor sie dann mit dH_2O eluiert werden konnte.

5.1.7 Ligation

Um das gewonnene Insert (siehe Kap. 5.1.4 oder 5.1.6) mit dem linearisierten Zielplasmid verbinden zu können, wird eine Ligation durchgeführt. Dafür werden DNA-Ligasen verwendet. Diese können freie 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatreste unter ATP-Verbrauch durch eine Phosphodiesterbindung kovalent miteinander verbinden. Um zu verhindern, dass während der Ligation der linearisierte Vektor rezirkularisiert, wurde dieser zunächst mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) behandelt. Dabei werden die am 5'-Ende gelegenen Phosphatgruppen der Vektor-DNA entfernt.

Für die Dephosphorylierung wurde folgender Ansatz gewählt:

50 μl Eluat Vektor
10 μl 10x SAP-Puffer
10 U SAP
ad 100 μl dH_2O

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP durch eine 15-minütige Inkubation bei 65 °C wieder inaktiviert. Um die Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA bestimmen zu können, wurde ein Agarosegel genutzt. Anhand der Banden des Größenmarkers und ihrer definierten Menge konnten dann die DNA-Konzentrationen abgeschätzt und so die molare Menge bestimmt werden. Für eine bestmögliche Effizienz der Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 verwendet. Der Ansatz wurde mit 2 µl T4-Ligase und 2 µl 10x T4-Puffer aufgefüllt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dieser Ansatz mit Hilfe einer Hitzeschocktransformation (siehe Kap. 5.1.1) in *E.coli* Bakterien des Stammes XL1-Blue eingebracht. Die vervielfältigte Plasmid-DNA konnte dann nach Anzucht der gewachsenen Kolonien aus den Bakterien präpariert (siehe Kap. 5.1.2) und sequenziert werden. Die Sequenzierung der Proben übernahm die Firma Seqlab in Göttingen. Dafür musste folgender Ansatz pipettiert werden:

1200 ng	Plasmid-DNA
30 pmol	<i>forward</i> Primer
30 pmol	<i>reverse</i> Primer
ad 15 µl dH ₂ O	

5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion lassen sich bestimmte DNA-Abschnitte, die man durch spezifische *forward*- und *reverse*-Primer definiert, vervielfältigen. Primer sind kurze Oligonukleotide, welche sich an einzelsträngige, komplementäre DNA-Abschnitte (*template*) lagern können und damit als Startpunkt für die DNA-Synthese durch eine DNA-Polymerase dienen. Neben der Ausgangs-DNA und dem spezifischen Primerpaar werden eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) zu dem PCR-Ansatz gegeben. Die dNTPs können durch die Polymerase verknüpft werden und so den komplementären DNA-Strang bilden. Die PCR ist in drei Phasen gegliedert: Zu Beginn werden die DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von 97 °C (Denaturierung) aufgetrennt, sodass sie als Einzelstränge vorliegen. In der zweiten Phase (*Annealing*) binden die Primer bei einer deutlich niedrigeren Temperatur (ca. 60 °C) an den spezifischen Bereich des einzelsträngigen *templates* und bilden somit den Startpunkt für die folgende

Elongations-Phase. Dabei wird nun der Einzelstrang wieder zu einem Doppelstrang ergänzt. Die Temperatur der Elongations-Phase (68-72 °C) ist abhängig von der jeweils verwendeten Polymerase und deren Temperaturoptimum.

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion dafür verwendet, um N- und C-terminale Restriktionsenzymschnittstellen einzufügen und um Gene in andere Vektoren zu ligieren. Dazu wurden für jede Reaktion spezifische *forward*- und *reverse*-Primer erstellt und eingesetzt (siehe Kap. 4.6.2).

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

100 ng	Ausgangs-DNA
2 µl (20 pmol)	<i>forward</i> -Primer
2 µl (20 pmol)	<i>reverse</i> -Primer
1 µl (100 nM)	dNTP-Mix
10 µl	5x HiFi-Puffer
0,5 µl (1 U)	Velocity DNA-Polymerase
	ad 50 µl dH ₂ O

Zyklusparameter:

97 °C	2 min	Denaturierung vor dem 1. Zyklus	
97 °C	30 sec	Denaturierung	} 25 Zyklen
60-70 °C	1 min	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
72 °C	5 min	Elongation	
8 °C	∞	Lagerung	

Alle Reaktionen wurden in einem programmierbaren Heizblock (Pecqlab) durchgeführt.

5.1.9 Mutagenese Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Q5 *Site-Directed* Mutagenese (NEB, Frankfurt a.M.) ermöglicht es, kleinere Punktmutationen, sowie Insertionen oder Deletionen in Plasmid-DNA einzufügen. Mit Hilfe der *NEBase Changer*-Software (<http://nebasechanger.neb.com>) wurden die jeweiligen Primer generiert und die dafür benötigte Schmelztemperatur ermittelt. Die Primer wurden so generiert, dass der *forward*-Primer die Nukleotidveränderungen in der Mitte der Sequenz trägt. An beiden Enden befinden sich Nukleotide, die komplementär zur Ausgangs-DNA sind und somit daran binden können. Der *reverse*-Primer bindet ebenfalls an die Ausgangs-DNA und wird so erstellt, dass er sich *back-to-back* an den *forward*-Primer lagert (siehe Abb. 5.1).

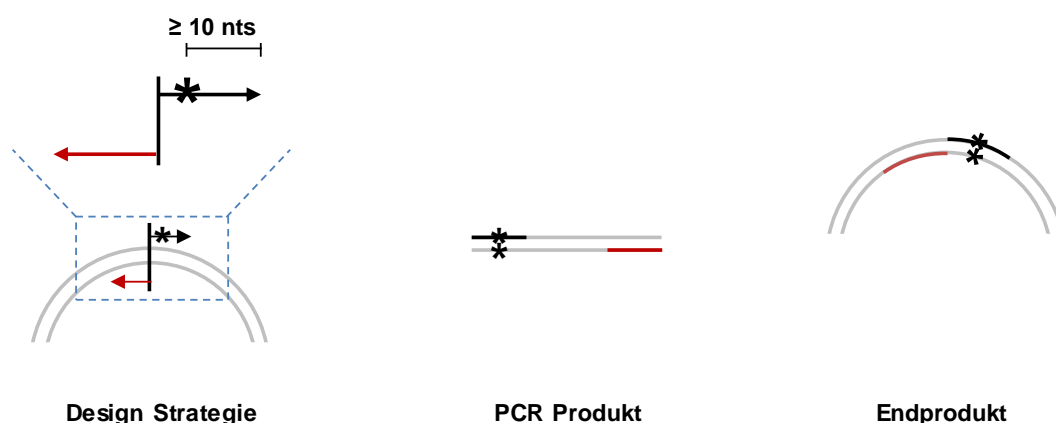


Abb. 5.1: Schematischer Ablauf der Q5 *Site-Directed* Mutagenese. Für die Substitution einer einzelnen Aminosäure werden die gewünschten Nukleotidveränderungen (gekennzeichnet durch *) in den *forward*-Primer (schwarz) eingebaut. Dieser enthält neben der Mutation mindestens zehn Nukleotide am 3'-Ende, die komplementär an die Ausgangs-DNA binden können. Der *reverse*-Primer (rot) wird so erstellt, dass sich die 5'-Enden der beiden Primer zusammenlagern. Modifiziert nach <https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit#product-protocols>.

Die Ausgangs-DNA und die generierten Primer wurden wie folgt in einer PCR eingesetzt:

PCR-Ansatz

12,5 µl Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix

Endkonzentration

1 x

1,25 µl <i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	0,5 µM
1,25 µl <i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	0,5 µM
2 µl Ausgangs-DNA	18 ng
ad 25 µl Nuklease-freies Wasser	

Das Programm für die PCR sah folgendermaßen aus:

98 °C	30 sec	Denaturierung	} 25 Zyklen
98 °C	2 min	Denaturierung	
50 – 72 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	30 sec/kb	Elongation	
72 °C	2 min	Finale Extension	
8 °C	∞	Lagerung	

Das erzeugte PCR-Produkt wurde mit dem KLD-Enzymmix sorgfältig durch auf- und abpipettieren durchmischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert:

1 µl	PCR-Produkt
5 µl	2x KLD-Reaktionspuffer
1 µl	10x KLD-Enzymmix
ad 10 µl Nuklease freies H ₂ O	

Der KLD-Enzymmix besteht aus einer Kinase, einer Ligase und dem Enzym DpnI. Mit Hilfe der Kinase werden zunächst die 5'-Enden der entstandenen DNA-Stränge phosphoryliert, sodass diese im nächsten Schritt durch die Ligase mit den 3'-OH Enden der DNA-Fragmente verbunden werden können. Dadurch entstehen zirkuläre Plasmide aus den neu synthetisierten DNA-Fragmenten. Das Restriktionsenzym DpnI

schneidet ausschließlich methylierte DNA. Damit wird noch vorhandenes Ausgangsplasmid abgebaut und sichergestellt, dass lediglich die mutierten Plasmide für die nachfolgende Transformation in Bakterien (siehe Kap. 5.1.1) verwendet werden.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zellkultur permanenter Zelllinien

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Nierenepithelzellen aus der afrikanischen Meerkatze (Vero76-Zellen) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die adhärentes Wachstum aufweist. Die Zellen wurden in Zellkulturgefäßen aus Kunststoff der Fa. Greiner unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Zellkulturmedien wurde *Dulbecco's modification of Eagle's medium* (DMEM) verwendet, dem 10 % fötales Kälberserum (FCS) sowie die Aminosäure L-Glutamin zugesetzt wurde. Um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurden dem Medium 100 Units/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin beigelegt. Waren die Zellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen, so mussten sie passagiert werden. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS_{def} gewaschen und anschließend in 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Sobald sich die Zellen abgerundet und vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden 7 ml DMEM hinzugegeben und die Zellen durch wiederholtes auf- und abpipettieren darin resuspendiert und vereinzelt. Das im Medium enthaltene FCS inaktiviert dabei das Trypsin/EDTA. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurden diese in einer entsprechenden Verdünnung auf eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Bei einer 1:10 Passage wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue Flasche gleicher Größe mit 19 ml frischem DMEM mit 10 % FCS gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis erneut ein konfluent Zellrasen entstand. Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert.

5.2.2 Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer kann die Zellzahl einer Zellsuspension ermittelt werden. Nachdem die Zählkammer und das Deckglas mit Ethanol gesäubert wurden, konnte das Deckglas vorsichtig auf den Glasschlitten geschoben werden, bis

Newton'sche Ringe zu erkennen waren. Anschließend wurden dann mit einer Pipette ca. 6 µl der Zellsuspension vorsichtig an den Rand des Deckglases gegeben, sodass sich die Flüssigkeit mit Hilfe von Kapillarkräften zwischen das Deckglas und den Glasschlitten ziehen konnte. Nun wurden die Zellen der vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Befanden sich zu viele Zellen in den Großquadraten, so musste eine Vorverdünnung angelegt werden. Um die Zellzahl pro Milliliter zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor } 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

5.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren permanenter Zelllinien wurde zunächst der konfluente Zellrasen einer 75 cm²-Zellkulturflasche wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellen resuspendiert. Nachdem die Zellen in Medium aufgenommen und in ein Zellkulturröhrchen überführt wurden, wurden sie für 10 min bei 500 g zentrifugiert. Das Pellet konnte dann in 3 ml Kulturmedium, welchem 10 % FCS, L-Glutamin, Antibiotika sowie 10 % steriles Glycerin zugesetzt waren, resuspendiert werden. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde dann in Einfriereröhrchen pipettiert und über Nacht in einer Einfrierbox in Isopropanol bei -80 °C gelagert, sodass die Zellen langsam einfrieren konnten. Am Folgetag wurden die Zellen zum langfristigen Lagern in einen Stickstofftank verlegt. Um Zellen wieder aufzutauen, wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, in frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden nun wieder bei 37 °C inkubiert und unter normalen Passagebedingungen (siehe Kap. 5.2.1) behandelt.

5.2.4 Aussäen von Zellen in 24- und 6-well-Vertiefungen

Nachdem die Zellen einer 250 ml (75 cm²) Zellkulturflasche abgelöst und in Zellkulturmedium vereinzelt waren, konnten sie auf verschiedene Vertiefungen ausgesät werden. Für eine 24-well-Vertiefung (optional mit einem Deckgläschen ausgelegt) wurden 1/400 bis 1/200 der Zellsuspension verwendet, für eine 6-well-Vertiefung 1/80 bis 1/60 der Suspension. Zuvor wurde das Zellkulturmedium DMEM in die Vertiefungen vorgelegt: 500 µl in ein 24-well und 3 ml in ein 6-well. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte wurden die Zellen gleichmäßig im Well verteilt. Die Zellen wurden nun für 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Transfektion der Zellen (siehe Kap. 5.2.5 und 5.2.6) erfolgte.

5.2.5 Transfektion mittels Lipofectamine™2000

Transfektion bezeichnet den Vorgang, bei dem eukaryotische Zellen fremde, frei vorliegende DNA oder RNA aufnehmen. Um Fremdgene in Zellen transient exprimieren zu können, wurden die Zellen mit Lipofectamine™ 2000 (LFA2000) transfiziert. Dieses Transfektionsreagenz beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Dabei wird die Plasmid-DNA durch polykationische Lipide komplexiert und kann die Zellmembran überwinden, um in das Zytoplasma und den Zellkern zu gelangen. Im Zellkern können die unter einem konstitutiven Promotor stehenden Fremdgene dann transkribiert werden. Für eine hohe Transfektionseffizienz spielt die Zelldichte sowie das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA in serumfreiem Medium (OptiMEM) eine entscheidende Rolle. Die Zelldichte sollte laut Herstellerangaben zwischen 70 und 80 % liegen, das Verhältnis von LFA2000 und DNA in OptiMEM beträgt 1,5 µl : 1 µg. Für die Transfektion in einem 24-well wurden 1,5 µl LFA2000 in 50 µl OptiMEM gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde 1 µg Gesamt-DNA mit 50 µl OptiMEM gemischt. Für ein 6-well wurden 7,5 µl LFA2000 und 5 µg DNA mit jeweils 250 µl OptiMEM versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der LFA2000-Ansatz zu dem DNA-Ansatz pipettiert und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben, bei denen zuvor das Zellkulturmedium gegen antibiotikafreies Transfektionsmedium ausgewechselt wurde. Nach 6 h wurde das Medium wieder gegen antibiotikahaltiges Zellkulturmedium getauscht, da das Transfektionsgemisch für die Zellen nach mehreren Stunden zu toxisch wird.

5.2.6 Transfektion mittels FuGENE HD

Das Transfektionsreagenz FuGENE HD, welches ebenfalls auf dem Prinzip der Bildung von kationischen DNA-Lipidkomplexen beruht, bietet eine weitere Möglichkeit, Zellen zu transfizieren. Im Gegensatz zu LFA2000 wirkt FuGENE HD weniger toxisch für Zellen und ist somit besser für die Transfektion primärer Zellen geeignet. Der Zellrasen sollte zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70 bis 80 % aufweisen. Für ein 24-well wurden 100 µl OptiMEM mit 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl FuGENE HD gemischt. Für die Transfektion in einem 6-well wurden 500 µl OptiMEM mit 5 µg DNA und 15 µl FuGENE HD gemischt. Während der Transfektionsansatz für 20 min bei RT inkubiert wurde, konnte das Medium auf den Zellen gewechselt werden. Bei einer Transfektion mit FuGENE HD ist es nicht notwendig, serumfreies Medium zu

verwenden. Im Gegensatz zu anderen Transfektionsreagenzien interagiert FuGENE HD nicht mit FCS, welches im Medium vorhanden ist. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das DNA-Transfektionsgemisch vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben. Auf Grund der geringen Toxizität von FuGENE ist es nicht notwendig, einen Mediumwechsel nach einigen Stunden durchzuführen.

5.2.7 Fusionsassay

Wenn Zellen, die den zellulären NiV-Rezeptor Ephrin-B2 oder Ephrin-B3 exprimieren, mit den beiden NiV-Oberflächen-Glykoproteinen F und G kotransfiziert werden, können diese mit ihren Nachbarzellen fusionieren. Dabei entstehen mehrkernige Riesenzellen, sogenannte Synzytien. Diese lassen sich im Durchlichtmikroskop gut beobachten. In dieser Arbeit wurde der Fusionsassay verwendet, um die Funktionalität (Fusionshelferaktivität) des KV-G Proteins in Zusammenarbeit mit dem KV-F oder NiV-F Glykoprotein zu analysieren.

Für den Fusionsassay wurden 70 bis 80 % konfluente Vero76-Zellen im 6-well mit Plasmiden für das wildtypische oder ein mutiertes KV-G Protein oder das NiV-G Protein jeweils zusammen mit Plasmiden für das NiV-F Protein kotransfiziert (siehe Kap. 5.2.5 und 5.2.6). 48 h p.t. wurden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit 70 %igem Ethanol für 10 min bei RT fixiert. Nachdem das Ethanol abgesaugt wurde, wurden 0,5 ml einer 1:10 in H₂O verdünnten Giemsa-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen wiederholt mit dH₂O gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Mittels Durchlichtmikroskopie (AMG Amex1100 Mikroskop, 200-fache Vergrößerung, Evos) konnten die Präparate analysiert und die Synzytienbildung ausgewertet und quantifiziert werden (Auszählen der Zellkerne pro Synzytium).

5.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz wird zur Detektion von Proteinen auf der Zelloberfläche oder, nach Permeabilisierung der Zelle, im Zellinneren angewendet. Dafür wird zunächst ein Erstantikörper auf die Zellen gegeben. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, wodurch es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen kommt. Anschließend wird ein Zweitantikörper zugegeben, der wiederum

den Fc-Teil des Erstantikörpers erkennt und daran bindet. An diesem Zweitantikörper ist ein Fluorochrom wie beispielsweise Rhodamin, FITC oder AlexaFluor-Farbstoffe gekoppelt. Das markierte Protein lässt sich nun durch Anregung mit Emissionslicht der passenden Wellenlänge und entsprechenden Filtersettings mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar machen. Zur Zellkernfärbung werden die Zellen mit DAPI (4,'6-Diamidin-2-phenylindol) inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA lagert.

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden Zellen auf Deckgläsern (DG) in 24-well-Vertiefungen ausgesät (siehe Kap. 5.2.4) und transfiziert (siehe Kap. 5.2.5). Da das Transfektionsreagenz FuGENE HD große DNA-Komplexe bildet, die durch die Inkubation mit DAPI-Farbstoffen sichtbar würden und somit die Analyse transfizierter Zellen stören würde, wurden Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen ausschließlich mit LFA2000 transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, bevor die Fixierung und wahlweise Permeabilisierung der Zellen erfolgte. Abhängig von der Färbung erfolgte dies entweder mit Methanol/Aceton (Met/Ac) 1:1 oder 2 % Paraformaldehyd (PFA) und 0,1 % Triton X-100. Für die Met/Ac Behandlung der Zellen wurden diese für 5 min auf Eis mit 300 µl eiskaltem Met/Ac inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Sollten die Zellen mit PFA fixiert werden, so wurden sie für 20 min mit 2 % PFA auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und für 5 min mit 0,1 M Glycin (gelöst in PBS⁺⁺) inkubiert, um restliches PFA abzusättigen. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 für 10 min auf Eis. Die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper, welcher in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺ verdünnt wurde, fand in einer „feuchten Kammer“ statt. Dafür wurde ein feuchtes Filterpapier mit Parafilm in eine Petrischale gelegt. Auf den Parafilm-Streifen wurden 20 µl der Primärantikörper-Lösung pro DG getropft und das DG mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C. Das DG wurde nun wieder mit der Zellseite nach oben in die 24-Well-Vertiefung zurückgelegt und dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurden 250 µl der Zweitantikörper-Lösung, welcher ebenfalls in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺ verdünnt war, in die Vertiefung pipettiert. Um die Zellkerne nachzuweisen wurde DAPI (1µg/µl in PBS⁺⁺ gelöst) im Verhältnis 1:10000 zur Zweitantikörper-Verdünnung gegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min im Dunkeln bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen wurde das DG einmal in H₂O geschwenkt, um Salzkristalle zu entfernen, und dann mit Mowiol eingedeckelt. Hierfür wurden 7 µl Mowiol auf einen Objektträger vorgelegt und das DG

mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Überschüssiges Mowiol konnte vorsichtig abgesaugt werden. Die Präparate wurden zum Aushärten über Nacht bei 4 °C gelagert, bevor sie am nächsten Tag am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) oder konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LeicaSP5) ausgewertet werden konnten.

5.3.2 Antibody Uptake Assay

Der *Antibody Uptake Assay*, welcher auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz basiert, dient dem qualitativen Endozytosenachweis von Oberflächenproteinen (siehe Abb. 5.2). Zellen, die das gewünschte Oberflächenprotein exprimieren, werden zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Nach Endozytose dieser Antigen-Antikörper-Komplexe werden die auf der Zelloberfläche verbliebenen gebundenen Erstantikörper mit einem AF488-markierten Zweitantikörper gefärbt. Anschließend werden die Zellen fixiert und permeabilisiert, sodass die endozytierten

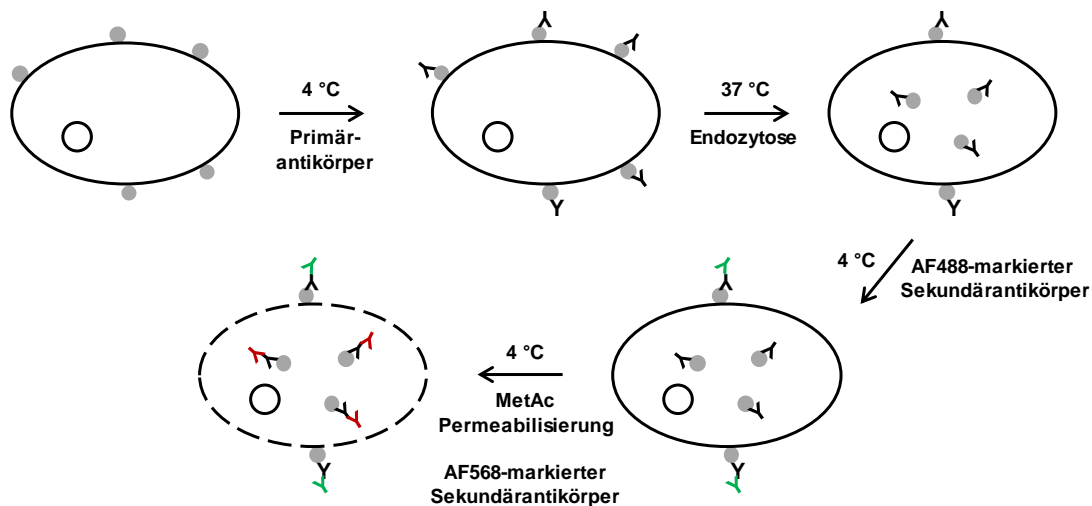


Abb. 5.2: Prinzip des Antibody Uptake Assays (modifiziert nach Vogt, 2004).

Proteine mit Erstantikörper nun über einen AF568-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen werden können. Ein nicht endozytiertes Protein zeigt demnach ausschließlich eine Oberflächenfluoreszenz, während ein endozytiertes Oberflächenprotein auch in intrazellulären Endozytosevesikeln nachzuweisen ist.

Um die Endozytoseaktivität des KV-G Proteins sowie der KV-G_{Y38A} Mutante zu untersuchen, wurden auf DG ausgesäte Vero76-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. 24 h p.t. wurden die unfixierten Zellen mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen das Oberflächenprotein gerichtet war, für 45 min auf Eis inkubiert. Um

ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in DMEM ohne FCS für 30 min bei 37 °C inkubiert, um Endozytose der Oberflächenproteine (mit gebundenen Primärantikörpern) zuzulassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ erfolgte die Inkubation der Zellen für 45 min bei 4 °C mit einem AF488-gekoppelten Zweitantikörper (1:50 in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺). Danach erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels Met/Ac auf Eis. Nun wurden die Zellen mit einem AF568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:250) für 45 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ und einmal mit H₂O gewaschen wurden, konnten die DG mit der Zellseite nach unten in Mowiol eingedeckelt werden. Nachdem die Präparate über Nacht bei 4 °C ausgehärtet waren, konnten sie am nächsten Tag mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LeicaSP5) ausgewertet werden.

5.3.3 Biotinylierung von Membranproteinen auf der Zelloberfläche

Mit Hilfe von Sulfo-NHS-Biotin lassen sich Membranproteine auf der Zelloberfläche gut markieren (Lisanti *et al.*, 1988). Die Interaktion, die zwischen Biotin und Streptavidin ausgebildet wird, ist eine der stärksten Bindungen, die in der Natur auftreten kann. Diese hohe Affinität beider Substanzen macht man sich bei der Biotinylierung von Membranproteinen zunutze.

Das in dieser Arbeit verwendete EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific; siehe Abb. 5.3) ist wasserlöslich, aber nicht membrangängig. Zudem bindet es unter Freisetzung des NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) -Esters an primäre Amine, d.h. an den Aminoterminus sowie die Seitenketten von Lysinresten in Proteinen. Um die Endozytose der zu markierenden Oberflächenproteine sowie des Biotins zu verhindern, wurde der gesamte Versuch auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt.

Zum Nachweis der Oberflächenexpression von KV-G und NiV-G Proteinen wurden Vero76-Zellen in 6-well Vertiefungen ausgesät und mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. 24 h p.t. wurde der konfluente Monolayer zunächst fünfmal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Danach erfolgte die Markierung der Oberflächenproteine durch die Zugabe von Biotin (1,2 mg EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin in 1 ml PBS⁺⁺ pro 6-Well) für 30 min. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Biotins zu gewährleisten, wurden die Zellen leicht schwenkend auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit 0,1 M Glycin/PBS⁺⁺ gewaschen, um ungebundenes Biotin abzusättigen und zu entfernen. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen mit 500 µl Puffer 1 [ohne BSA, + 1:100 Proteaseinhibitor (PI)] (siehe

Kap. 4.11) für 30 min auf dem Schüttler lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit Hilfe von Zellschabern abgekratzt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um zelluläre Bestandteile zu entfernen, wurde ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C durchgeführt. Die Lysat-Überstände wurden anschließend für eine Präzipitation mit NeutrAvidin-Beads verwendet. Hierbei handelt es sich um eine deglykosylierte Form von Avidin, die kovalent an Agarose-Beads gekoppelt vorliegt. Zur Kontrolle der Gesamtproteinexpression wurden 50 µl des Zelllysates vor der Zugabe zu den NeutrAvidin-Beads entnommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 96 °C für 5 min aufgekocht und bei -20 °C gelagert. Für die Präzipitation wurden am Vortag für jedes Zelllysate eines 6-wells 60 µl Neutravidin-Beads in 1 ml Puffer 1 (+ BSA; siehe Kap. 4.11) aufgenommen und über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C gelagert, sodass die Beads aufquellen konnten. Am Folgetag wurden die Beads zweimal mit Puffer 1 (+ BSA) gewaschen, indem sie jeweils für 2 min und 6.000 rpm zentrifugiert wurden. Der Wasch-Überstand wurde verworfen. Dann wurde an den Rand des Reaktionsgefäßes 1 µl PI und 10 µl 10 % BSA hinzupipettiert und anschließend die Zelllysate zu den NeutrAvidin-Beads gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads bei 14.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Dieser erste Präzipitations-Überstand wurde bei 4 °C gelagert. Hierbei handelt es sich um nicht biotinylierte, also intrazelluläre Proteine, die als Kontrolle, der nicht präzipitierten, d.h. nicht biotinylierten Proteine, verwendet werden können. Zur Gewinnung der präzipitierten Proteine wurden die NeutrAvidin-Beads jeweils einmal mit Puffer 1 (+ BSA), Puffer 2 und Puffer 3 sowie dreimal mit Puffer 4 (siehe Kap. 4.11) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand komplett verworfen und die Beads in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer (mit/ohne 0,1 M DTT)

aufgenommen. Die Proben wurden dann für 5 min bei 96 °C aufgeköcht, sodass sich die präzipitierten Proteine von den NeutrAvidin-Beads lösen konnten. Anschließend wurden die Proben auf einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt.

5.3.4 Quantitativer Endozytosenachweis durch Oberflächenbiotinylierung und MESNA-Reduktion

Die MESNA-Reduktion ist ein quantitativer Endozytosenachweis, mit dem Unterschiede in der Endozytoserate einzelner Proteine untersucht werden können. Hierzu werden die Membranproteine auf der Zelloberfläche biotinyliert, d.h. ein Derivat des Biotins bindet kovalent an freie Aminogruppen. Das bei der MESNA-Reduktion verwendete wasserlösliche Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific; siehe Abb. 5.4) enthält eine zentrale Disulfidbrücke, an der durch das nicht-membrangängige Reduktionsmittel 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA, Sigma-Aldrich) der Biotinrest von dem Teil des Moleküls abgespalten wird, der kovalent an die Oberflächenproteine

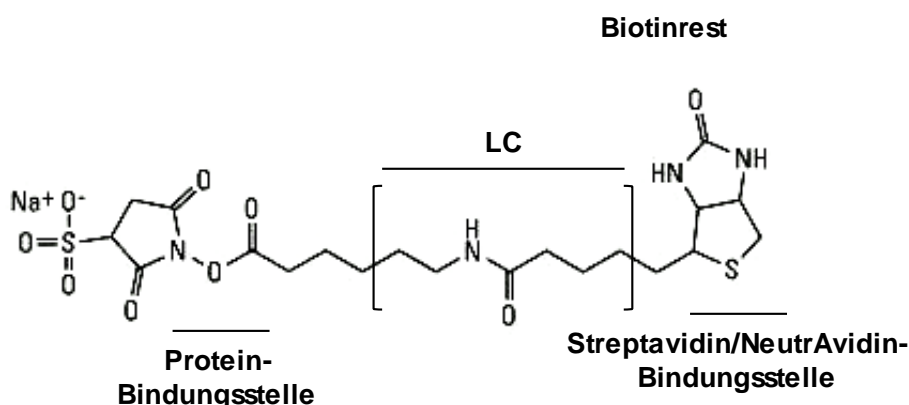


Abb. 5.3: Struktur von Sulfo-NHS-LC-Biotin mit wichtigen Moleküldomänen. Modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21335>.

gebunden ist (vgl. Abb.5.4). Nach der MESNA-Reduktion können biotinylierte Proteine nicht mehr durch Streptavidin nachgewiesen werden. Findet die Reduktion auf Eis statt, sind alle endozytierten, biotinylierten Proteine vor der MESNA-Reduktion geschützt und können über Streptavidin-Bindung nachgewiesen werden.

Für die MESNA-Reduktion wurden Vero76-Zellen, die für 24 h mit entsprechenden Plasmiden transfiziert waren, wie in Kap. 5.3.2 beschrieben biotinyliert. Anschließend wurde für verschiedene Zeiten Endozytose zugelassen (siehe Abb. 5.5). Dann werden

die Zellen mit MESNA inkubiert, sodass das Biotin von den an der Oberfläche verbliebenen Proteinen abgespalten werden konnte. Endozytierte, biotinylierte Proteine waren dabei vor dem Reduktionsmittel geschützt und konnten dann nach Zelllyse, Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Blotting durch Streptavidin detektiert werden. Zusätzlich wurden zwei Kontrollansätze mitgeführt: Bei beiden Ansätzen wird keine Endozytose zugelassen und damit verbleiben alle biotinylierten Proteine auf der Oberfläche. Einer der Ansätze wird mit MESNA behandelt und dient als Kontrolle für die vollständige Reduktion (MESNA-Kontrolle). Der andere Ansatz bleibt unbehandelt. Hiermit wird die Gesamtmenge (100 %) an markierten Oberflächenproteinen ermittelt (Gesamt-Biotin-Kontrolle), auf die die Menge an endozytierten Proteinen bezogen werden muss. Es wurden vier 3,5 cm-Schälchen transfiziert (siehe Kap. 5.2.5 und 5.2.6). 24 h p.t. wurden die Zellen 3x mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und dann auf Eis zweimal für 20 min mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin (2 mg/ml in PBS⁺⁺) markiert. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit 0,1 M Glycin in PBS⁺⁺ zur Absättigung von überschüssigem Biotin. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit vorgewärmtem, FCS-freien Medium für verschiedene Zeiten (5 bis 30 min)

bei 37 °C inkubiert, um Endozytose der biotinylierten Oberflächenproteine zuzulassen. Die beiden Kontrollansätze verblieben auf Eis. Nach dieser Inkubation wurden die Proben sofort mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit MESNA reduziert. Dabei erfolgte dreimal für je 20 min eine Inkubation mit 50 mM MESNA-Lösung (8,2 mg MESNA in 1 ml MESNA-Puffer). Die Gesamt-Biotin-Kontrolle wurde nicht mit MESNA behandelt. Dann folgten drei Waschschrte mit 20 mM HEPES (in PBS⁺⁺) und einmal mit PBS⁺⁺. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (+1:100 PI, Calbiochem) für 30 min auf Eis lysiert und das Zelllysate in ein Reaktionsgefäß überführt. Mit einer Zentrifugation mit 13.000 rpm für 45 min bei 4 °C wurden unlösliche Membranteile und Zellkerne pelletiert. Der Überstand wurde dann für eine Immunpräzipitation (siehe Kap. 5.3.5) verwendet.

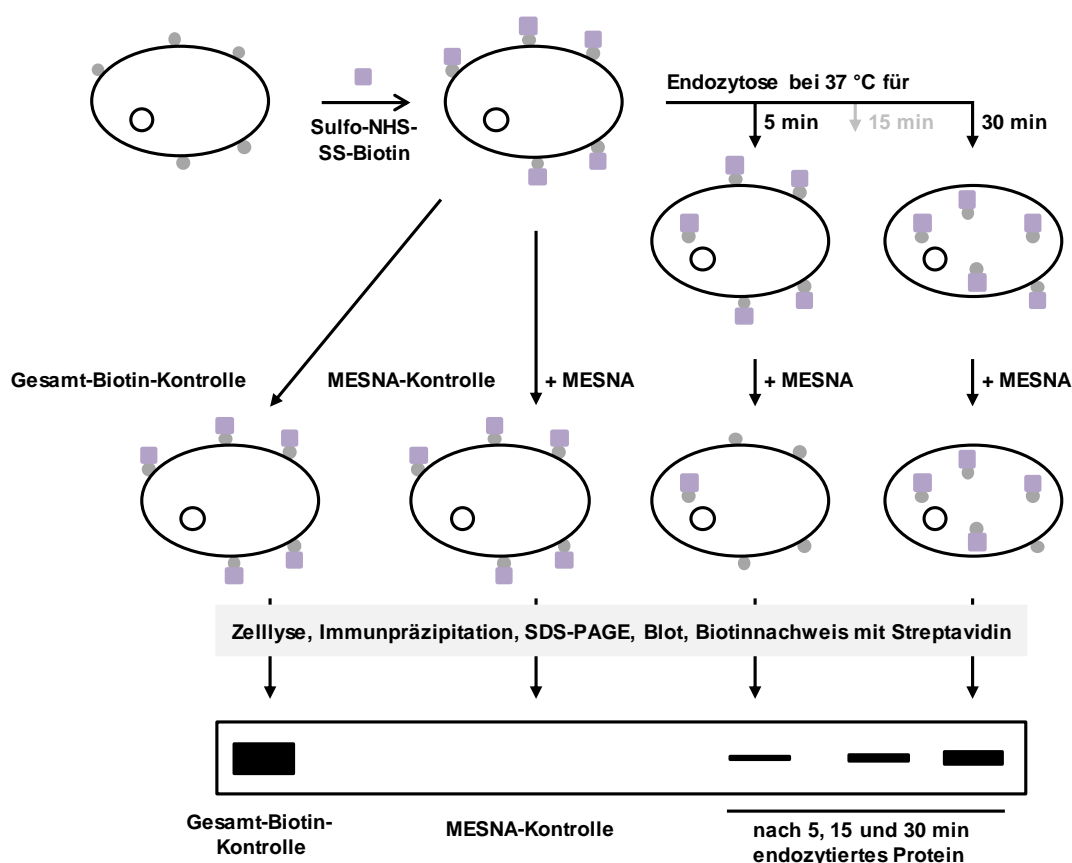


Abb. 5.5: Prinzip der MESNA-Reduktion (modifiziert nach Vogt, 2004).

5.3.5 Immunpräzipitation

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP) lassen sich lösliche Proteine selektiv aus einem heterogenen Proteingemisch isolieren, beispielsweise durch Verwendung spezifischer Antikörper aus einem Zelllysat. Die dabei entstandenen Antikörper-Protein-Komplexe lassen sich anschließend mit Protein A-Sepharose aus der Suspension präzipitieren. Dabei bindet das Protein A, ein Zellwandbestandteil des Bakterium *Staphylococcus aureus*, an den konstanten Fc-Teil des Antikörpers. Da das Protein A zusätzlich an Sepharose-Beads gekoppelt ist, kann dieser gesamte Komplex über mehrere Zentrifugationsschritte aus dem Lysat getrennt werden.

Zur Präzipitation der NiV-G und KV-G Proteine wurden spezifische anti-HA_{tag} Antikörper aus Kaninchen (im Verhältnis 1:500) gegen den angefügten HA_{tag} der Proteine zum Zelllysat gegeben, welches dann über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurde die in dH₂O aufgequollene Protein A-Sepharose dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen, bevor sie 50 %ig in RIPA (+ 1:100 PI) aufgenommen wurde. Von diesem Gemisch wurden 40 µl zu jedem Zelllysat-Ansatz gegeben und für 45 min bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert, um die Antikörper-Protein-Komplexe zu präzipitieren. Anschließend wurden die Proben dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Dafür wurden die Proben mit jeweils 300 µl RIPA-Puffer versetzt und für 1 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sepharose-Pellet in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer (ohne oder mit 0,1 M DTT/4 % β-ME) aufgenommen und für 10 min bei 96 °C aufgeköcht, um die gefällten Proteine von der Sepharose zu lösen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurden die Proteine auf eine 10 % ige SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.6).

5.3.6 SDS-PAGE

Mit Hilfe einer diskontinuierlichen Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) lassen sich Proteine auf Grund ihrer Massenunterschiede unter denaturierenden Bedingungen auftrennen (Laemmli, 1970). Dafür werden die Proteine mit einem SDS-haltigen Probenpuffer versetzt. Das anionische Detergenz SDS, welches sich an die Aminosäurereste anlagert, dient hierbei der Zerstörung aller nicht kovalenten Wechselwirkungen im Protein. Somit werden alle Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen aufgelöst. Zusätzlich verleihen die SDS-Anionen dem Protein proportional zu seiner Masse eine negative Ladung. Wird β-Mercaptoethanol (β-ME)

oder Dithiothreitol (DTT) dem Probenpuffer zugefügt, so werden Disulfidbrücken zwischen Proteinen oder einzelnen Proteinuntereinheiten reduziert. Ohne die Zugabe erfolgt die Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen. Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen werden Sammelgele und Trenngele aus Polyacrylamid verwendet. Die Gele bestehen aus Poren, deren Vernetzungsgrad durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt werden kann. Die durch gebundenes SDS negativ geladenen Proteine trennen sich nun beim Lauf durch das Gel anhand ihrer Größe auf, da kleinere Proteine schneller durch die Poren des Gels gelangen. Die Verwendung eines niedrig konzentrierten Sammelgels gewährleistet das gleichzeitige Einlaufen aller Proteine in das nachfolgende Trenngel. Ein mitgeführter Größenstandard (Prestained Protein Marker, LI-COR) ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Proteine.

Für den Nachweis radioaktiv markierter Proteine (siehe Metabolische Markierung von Proteinen 5.3.8) wird ein Röntgenfilm mehrere Tage auf das fixierte und getrocknete Gel gelegt. Um Proteine mittels Antikörperfärbung nachzuweisen, können die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden (siehe Kap. 5.3.7) und dort nachgewiesen werden (z.B. im Western Blot).

In dieser Arbeit wurden 3,75 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele verwendet, die wie folgt hergestellt wurden:

Zuerst wurde die Gelapparatur zusammengebaut. Dafür wurden je eine große und eine kleine Glasplatte mit 70 %igem Ethanol gereinigt und dann, getrennt durch Abstandshalter (*spacer*) in die Gießvorrichtung eingespannt. Um die Dichtigkeit der Gelapparatur zu überprüfen, wurde diese mit dH₂O aufgefüllt und der Wasserstand kontrolliert. Anschließend wurden die Acrylamid-Lösungen für Trenn- und Sammelgel angesetzt. Folgendes Rezept ist ausreichend für zwei Gele:

	Trenngel:	Sammelgel:
dH ₂ O	3 ml	3,4 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	0,6 ml
30 % Acrylamid	3 ml	0,6 ml
TEMED	14 µl	10 µl

10 % APS

80 µl

40 µl

Unmittelbar nach der Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat (APS), die als Katalysatoren zur Beschleunigung der Polymerisation dienen, wurden 3,4 ml der Trenngel-Lösung zwischen die Glasplatten im Gießständer gegossen und mit dH₂O überschichtet. So erhält das Trenngel eine gleichmäßig waagerechte Oberkante. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 15 min) wurde das Wasser vorsichtig abgegossen und das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm mit der benötigten Anzahl an Probenaschen wurde luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Keutz-Miniprotein-Gelkammer eingebaut und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Nachdem der Kamm entfernt und die Taschen ausgespült wurden, konnten die Proben mit einer Hamilton-Pipette in die Taschen gefüllt werden. Zum langsamen Einlaufen der Proben wurde eine geringe Spannung von 80 V angelegt. Sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Anhand der Bromphenolblau-Bande sowie des mitgeführten Größenstandards konnte der Lauf der Elektrophorese verfolgt und nach ausreichender Auftrennung gestoppt werden.

5.3.7 Proteintransfer auf Nitrozellulose mittels Elektroblothing (*Semi-Dry-Blot*)

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können über Elektroblothing auf eine Nitrozellulose (NC)-Membran übertragen werden. Im elektrischen Feld wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode und binden irreversibel an die NC-Membran. Die Stromstärke, die für das Blothing benötigt wird, ist proportional zur Fläche des Gels und beträgt 0,8 mA/cm². Um zu gewährleisten, dass alle Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 – 200 kDa auf die Membran übertragen werden, sollte die Transferzeit mindestens 1 h betragen. In dieser Arbeit wurde das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) angewandt. Dafür wurden die NC-Membran, das SDS-Gel sowie acht Whatmann-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und wie in folgender Abbildung dargestellt luftblasenfrei auf der Anoden-Kohleplatte der Blokkammer geschichtet und mit der Kathoden-Platte abgedeckt (vgl. Abb. 5.4).

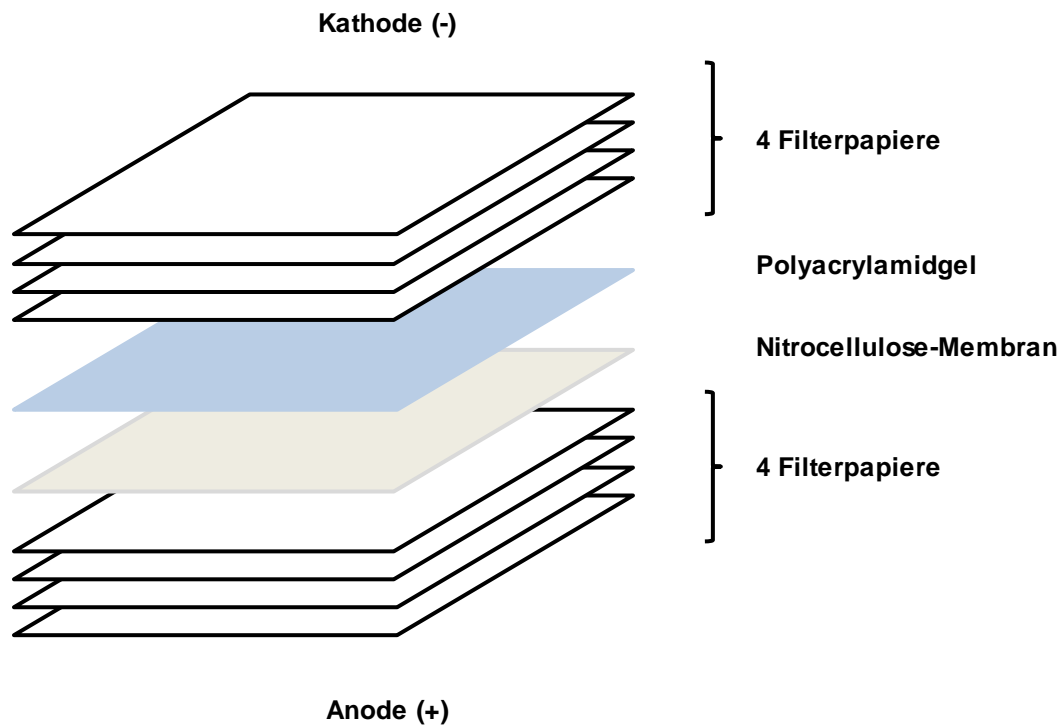


Abb. 5.6: Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots.

Um große Proteine vollständig zu übertragen, wurde eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ NC-Membran für 2 h angelegt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulose wurde diese anschließend entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5 %iger Milchpulverlösung (in $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween 20) schüttelnd inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween 20 konnte die Membran bei 4°C gelagert oder der Proteinnachweis durchgeführt werden.

5.3.8 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose

5.3.8.1 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von HA_{tag} -markierten Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran wurde ein sogenannter Zweifachaufbau aus Antikörpern verwendet. Der Erstantikörper (aus Maus; 1:1000), welcher spezifisch gegen den HA_{tag} gerichtet war, wurde in $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween 20 verdünnt und entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur mit der NC-Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween 20 für jeweils 10 min gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die Inkubation des anti-Maus IRDye800-gekoppelten Zweitantikörpers, welcher ebenfalls in $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween 20 verdünnt

wurde (1:5000), erfolgte schüttelnd für 45 min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen konnten die gebundenen Antikörper mit Hilfe des *Odyssey infrared imaging system* (LI-COR) detektiert werden.

5.3.8.2 Nachweis biotinylierter Membranproteine mittels Streptavidin

Biotinylierte Proteine können nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe einer an Streptavidin gekoppelten Peroxidase detektiert werden. Wie bereits beschrieben, gehen Biotin und Streptavidin eine starke, nichtkovalente Bindung ein. Diese macht man sich hier zunutze. Gibt man nun das Substrat Luminol + H₂O₂ hinzu, so wird dieses unter Lichtemission oxidiert. Diese Reaktion wird als *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) beschrieben.

Nach Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran und anschließender Absättigung der Membran mittels Inkubation in einer 5 %igen Milchpulver-Lösung, wurde die Membran mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) 1:4000 in PBS_{def}/0,1 % Tween 20 für 45 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS_{def}/0,1 % Tween 20 und einmal mit PBS_{def} gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Peroxidase wurde die Membran für 5 min in 1 ml *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* inkubiert. Diese Chemilumineszenz-Lösung wird im Verhältnis 1:1 aus zwei Komponenten (Luminol/*Enhancer* und Peroxid-Puffer) zusammengesetzt. Die Entwicklung der Membran erfolgte direkt im Anschluss am Chemidoc (Biorad).

5.3.9 Metabolische Markierung von Proteinen (*Pulse Chase*)

Mit Hilfe eines *Pulse Chase*-Versuches ist es möglich, Proteine im Verlauf ihrer Synthese in eukaryotischen Zellen radioaktiv zu markieren und anschließend ihren Transport oder Abbau oder ihre Prozessierung innerhalb der Zelle zu analysieren. Als *Pulse* bezeichnet man dabei die Phase, in der die Proteine während ihrer Synthese mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein ([³⁵S]-Promix) radioaktiv markiert werden. Anschließend erfolgt der *Chase*, unterschiedliche lange Zeitintervalle, in denen die Zellen in nicht radioaktivem Medium inkubiert werden. Während dieser Zeit können die markierten Proteine transportiert, prozessiert oder auch degradiert werden. Nachdem die Zellen lysiert wurden, werden die Proteine spezifisch mittels Immunpräzipitation (siehe Kap. 5.3.5) präzipitiert und anschließend auf einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Auf 6-well ausgesäte Vero76-Zellen wurden mit pCG-NiV-G oder pCG-KV-G transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit Mangelmedium, welches weder

Cystein noch Methionin enthält, gewaschen und für 1 h bei 37 °C in 1 ml Mangelmedium inkubiert. Diesen Vorgang beschreibt man als „Aushungern der Zellen“. Dann erfolgt die radioaktive Markierung der Proteine. Dafür werden die Zellen für 30 min in 500 µl Markierungsmedium (Mangelmedium mit 10 µl [³⁵S]-Promix; entspricht 100 µCi radioaktivem Cystein und Methionin) inkubiert. Nachdem das Markierungsmedium abgenommen wurde, wurden die Zellen entweder für zwei weitere Stunden bei 37 °C in DMEM inkubiert, oder direkt mit RIPA-Puffer (+ 1:100 PI) lysiert. Die Proteine wurden aus den Lysaten präzipitiert, das Präzipitat wurde auf einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, bis die blaue Farbbande des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das SDS-Gel zuerst für 30 min in Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) und anschließend für 30 min in *Enhancer*-Lösung (Enlightning) inkubiert. Nachdem das Gel unter Verwendung einer Trockenapparatur getrocknet war, wurde für 4 Tage ein Röntgenfilm (*Medical X-Ray screen film blue sensitive*; Raymed Imaging) aufgelegt.

5.3.10 Endoglykosidase-Behandlung metabolisch markierter Proteine

Die Endoglykosidase-Behandlung von Proteinen gibt Auskunft darüber, in welchen Glykosylierungsformen Proteine vorliegen. Dafür werden die beiden Glykosidasen Endo H und PNGase F verwendet. Im Gegensatz zu Endo H, welches lediglich Asparagin-glykosylierte Mannose-reiche Formen abspalten kann, kann PNGase F zusätzlich auch komplex glykosylierte Zuckerketten spalten.

Die Glykosidase-Behandlung der Proteine wurde nach deren metabolischer Markierung (siehe Kap. 5.3.9) durchgeführt. Nachdem die Proteine mittels Immunpräzipitation spezifisch aus dem Lysat präzipitiert wurden, wurden diese mit 2x SDS-Probenpuffer, der 4 % β-ME enthielt, versetzt und für 10 min bei 96 °C aufgekocht. Anschließend konnten die unterschiedlichen Endoglykosidasen mit ihren jeweiligen Puffern zum Präzipitat hinzugegeben werden:

<u>EndoH-Verdau</u>		<u>PNGase F-Verdau</u>	
Präzipitat	20 µl	Präzipitat	20 µl
Endo H	4 µl (2000 U)	PNGase F	2 µl (1000 U)
10x Probenpuffer	2 µl	10x NP40-Puffer	2 µl
		10x G7-Puffer	2 µl

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden die Proben unmittelbar über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für jeweils 30 min in Fixier-Lösung und dann in *Enhancer*-Lösung schüttelnd inkubiert. Um die Proteine detektieren zu können, wurde ein Röntgenfilm (*Medical X-Ray screen film blue sensitive*; Raymed Imaging) für 4 Tage aufgelegt.

5.3.11 Bestimmung der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie wird verwendet, um bestimmte Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Fluoreszenzintensität einzelner Zellen in Suspension zu bestimmen. Zusätzlich können intrazelluläre Proteine oder Oberflächenproteine, welche mit spezifischen Primär- und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern markiert sind, nachgewiesen werden. Dafür werden die in Lösung vorliegenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren dann einen Laserstrahl. Dieser erfasst und analysiert jede Zelle einzeln, indem die Fluoreszenzemission und die Streuung des einfallenden Laserlichts bestimmt werden (siehe Abb. 5.7).

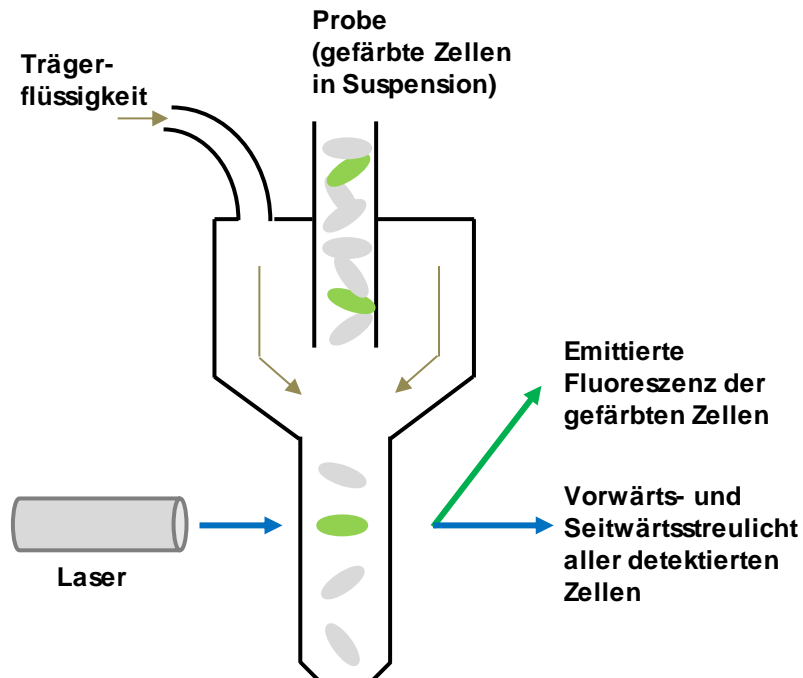


Abb. 5.7: Schematischer Aufbau der Durchflusszytometrie.

Zur Bestimmung der Gesamt- oder Oberflächenexpression der G-Proteine wurden Vero76-Zellen auf 6-wells ausgesät und mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl Accutase ersetzt, um die Zellen vom well abzulösen. Dafür wurden sie für 10 – 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden für 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl FACS-Puffer (PBS_{def} + 1 % BSA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Um die Zellen zu fixieren wurden sie in 100 µl 0,5 % PFA aufgenommen und für 15 min inkubiert. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte anschließend eine weitere Inkubation mit 0,2 % Saponin für 15 min. Da die Permeabilisierung durch Saponin reversibel ist, mussten alle nachfolgenden Schritte mit dem Saponin-FACS-Puffer durchgeführt werden. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Erstantikörper-Inkubation. Hierzu wurden die Zellen in 100 µl Antikörper-Lösung (anti-HA aus Maus; 1:500) für 45 min inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Zellen fünfmal gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG FITC; 1:200) für 30 min im Dunkeln. Nachdem die Zellen erneut fünfmal gewaschen wurden, wurden sie in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und konnten am *Guava Easy Cyte Mini System* (Guava Technologies) analysiert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cytosoft 4.2 Software (Guava Technologies).

VI Literaturverzeichnis

- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briesse T, et al: **Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016.** *Arch Virol* 2016, **161**:2351-2360.
- Aguilar HC, Matreyek KA, Filone CM, Hashimi ST, Levroney EL, Negrete OA, Bertolotti-Ciarlet A, Choi DY, McHardy I, Fulcher JA, et al: **N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry.** *J Virol* 2006, **80**:4878-4889.
- Anonymous: **Nipah virus outbreak(s) in Bangladesh, January-April 2004.** In *Wkly Epidemiol Rec* 2004, vol. 79. pp. 168-171; 2004:168-171.
- Attwood BK, Patel S, Pawlak R: **Ephs and ephrins: emerging therapeutic targets in neuropathology.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012, **44**:578-581.
- Baker KS, Todd S, Marsh GA, Crameri G, Barr J, Kamins AO, Peel AJ, Yu M, Hayman DT, Nadjm B, et al: **Novel, potentially zoonotic paramyxoviruses from the African straw-colored fruit bat *Eidolon helvum*.** *J Virol* 2013, **87**:1348-1358.
- Behner L: **Charakterisierung des Glykoproteins G des neu entdeckten afrikanischen Henipavirus GH-M74a .** 2013. (Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg)
- Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF: **Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:10694-10699.
- Biering SB, Huang A, Vu AT, Robinson LR, Bradel-Tretheway B, Choi E, Lee B, Aguilar HC: **N-Glycans on the Nipah virus attachment glycoprotein modulate fusion and viral entry as they protect against antibody neutralization.** *J Virol* 2012, **86**:11991-12002.
- Bishop KA, Hickey AC, Khetawat D, Patch JR, Bossart KN, Zhu Z, Wang LF, Dimitrov DS, Broder CC: **Residues in the stalk domain of the hendra virus g glycoprotein modulate conformational changes associated with receptor binding.** *J Virol* 2008, **82**:11398-11409.
- Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Mungall BA, Bishop KA, Choudhry V, Dimitrov DS, Wang LF, Eaton BT, Broder CC: **Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:10652-10657.
- Bossart KN, McEachern JA, Hickey AC, Choudhry V, Dimitrov DS, Eaton BT, Wang LF: **Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems.** *J Virol Methods* 2007, **142**:29-40.
- Bossart KN, Tachedjian M, McEachern JA, Crameri G, Zhu Z, Dimitrov DS, Broder CC, Wang LF: **Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors.** *Virology* 2008, **372**:357-371.
- Bossart KN, Wang LF, Flora MN, Chua KB, Lam SK, Eaton BT, Broder CC: **Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins.** *J Virol* 2002, **76**:11186-11198.
- Bossart KN, Zhu Z, Middleton D, Klippel J, Crameri G, Bingham J, McEachern JA, Green D, Hancock TJ, Chan YP, et al: **A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000642.
- Bowden TA, Crispin M, Harvey DJ, Aricescu AR, Grimes JM, Jones EY, Stuart DI: **Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a**

- template for antiviral and vaccine design.** *J Virol* 2008, **82**:11628-11636.
- Bradel-Tretheway BG, Liu Q, Stone JA, McNally S, Aguilar HC: **Novel Functions of Hendra Virus G N-Glycans and Comparisons to Nipah Virus.** *J Virol* 2015, **89**:7235-7247.
- Broder CC: **Henipavirus outbreaks to antivirals: the current status of potential therapeutics.** *Curr Opin Virol* 2012, **2**:176-187.
- Brook CE, Dobson AP: **Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens.** *Trends Microbiol* 2015, **23**:172-180.
- Butler D: **Fatal fruit bat virus sparks epidemics in southern Asia.** *Nature* 2004, **429**:7.
- Calain P, Roux L: **The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA.** *J Virol* 1993, **67**:4822-4830.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T: **Bats: important reservoir hosts of emerging viruses.** *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**:531-545.
- Prevention CfDCA: **Outbreak of Hendra-like virus – Malaysia and Singapore, 1998-1999.** vol. 281. pp. 1787-1788: JAMA; 1999:1787-1788.
- Chadha MS, Comer JA, Lowe L, Rota PA, Rollin PE, Bellini WJ, Ksiazek TG, Mishra A: **Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:235-240.
- Chakraborty AK, Chakravaty AK: **Dichotomy of lymphocyte population and cell-mediated immune responses in a fruit bat.**, vol. 64. pp. 157-168: J. Ind. Inst. Sci.; 1983:157-168.
- Chakravarty AK, Sarkar SK: **Immunofluorescence analysis of immunoglobulin bearing lymphocytes in the Indian fruit bat: *Pteropus giganteus*.** *Lymphology* 1994, **27**:97-104.
- Chan YP, Chua KB, Koh CL, Lim ME, Lam SK: **Complete nucleotide sequences of Nipah virus isolates from Malaysia.** *J Gen Virol* 2001, **82**:2151-2155.
- Chang A, Dutch RE: **Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end.** *Viruses* 2012, **4**:613-636.
- Chen JM, Yu M, Morrissy C, Zhao YG, Meehan G, Sun YX, Wang QH, Zhang W, Wang LF, Wang ZL: **A comparative indirect ELISA for the detection of henipavirus antibodies based on a recombinant nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*.** *J Virol Methods* 2006, **136**:273-276.
- Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columna-Vingno AB, Malbas FF, Bolo GC, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, et al: **Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014.** *Emerg Infect Dis* 2015, **21**:328-331.
- Choi C: **Nipah's return. The lethal "flying fox" virus may spread between people.** *Sci Am* 2004, **291**:21A, 22.
- Chong HT, Kamarulzaman A, Tan CT, Goh KJ, Thayaparan T, Kunjapan SR, Chew NK, Chua KB, Lam SK: **Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin.** *Ann Neurol* 2001, **49**:810-813.
- Chow VT, Tambyah PA, Yeo WM, Phoon MC, Howe J: **Diagnosis of nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid.** *J Clin Virol* 2000, **19**:143-147.
- Chua KB: **Nipah virus outbreak in Malaysia.** *J Clin Virol* 2003, **26**:265-275.
- Chua KB, Chua BH, Wang CW: **Anthropogenic deforestation, El Niño and the emergence of Nipah virus in Malaysia.** *Malays J Pathol* 2002, **24**:15-21.
- Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT: **Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia.** *Lancet* 1999, **354**:1257-1259.
- Chua KB, Koh CL, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, Chua BH, Chan YP, Lim ME, Lam SK: **Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes.** *Microbes Infect* 2002,

4:145-151.

- Chua KB, Lam SK, Tan CT, Hooi PS, Goh KJ, Chew NK, Tan KS, Kamarulzaman A, Wong KT: **High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid.** *Ann Neurol* 2000, **48**:802-805.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH: **One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:2172-2175.
- de Wit E, Prescott J, Falzarano D, Bushmaker T, Scott D, Feldmann H, Munster VJ: **Foodborne transmission of nipah virus in Syrian hamsters.** *PLoS Pathog* 2014, **10**:e1004001.
- DeFrees SL, Wilson DE: **Eidolon helvum.** vol. 312. pp. 1-5. *Mammalian Species*; 1988:1-5.
- Diederich S, Dietzel E, Maisner A: **Nipah virus fusion protein: influence of cleavage site mutations on the cleavability by cathepsin L, trypsin and furin.** *Virus Res* 2009, **145**:300-306.
- Diederich S, Moll M, Klenk HD, Maisner A: **The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment.** *J Biol Chem* 2005, **280**:29899-29903.
- Diederich S, Sauerhering L, Weis M, Altmeppen H, Schaschke N, Reinheckel T, Erbar S, Maisner A: **Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment.** *J Virol* 2012, **86**:3736-3745.
- Diederich S, Thiel L, Maisner A: **Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry.** *Virology* 2008, **375**:391-400.
- Dietzel E, Kolesnikova L, Sawatsky B, Heiner A, Weis M, Kobinger GP, Becker S, von Messling V, Maisner A: **Nipah Virus Matrix Protein Influences Fusogenicity and Is Essential for Particle Infectivity and Stability.** *J Virol* 2015, **90**:2514-2522.
- Dobson AP: **Virology. What links bats to emerging infectious diseases?** *Science* 2005, **310**:628-629.
- Drexler JF, Corman VM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Annan A, Ipsen A, Kruppa T, Müller MA, Kalko EK, Adu-Sarkodie Y, et al: **Henipavirus RNA in African bats.** *PLoS One* 2009, **4**:e6367.
- Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, et al: **Bats host major mammalian paramyxoviruses.** *Nat Commun* 2012, **3**:796.
- Dutch RE, Jardetzky TS, Lamb RA: **Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis.** *Biosci Rep* 2000, **20**:597-612.
- Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang LF: **Hendra and Nipah viruses: different and dangerous.** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:23-35.
- Eaton BT, Wright PJ, Wang LF, Sergeyev O, Michalski WP, Bossart KN, Broder CC: **Henipaviruses: recent observations on regulation of transcription and the nature of the cell receptor.** *Arch Virol Suppl* 2004:122-131.
- Egelman EH, Wu SS, Amrein M, Portner A, Murti G: **The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states.** *J Virol* 1989, **63**:2233-2243.
- Enserink M: **New virus fingered in Malaysian epidemic.** *Science* 1999, **284**:407, 409-410.
- Enserink M: **Emerging infectious diseases. Nipah virus (or a cousin) strikes again.** *Science* 2004, **303**:1121.
- Epand RM: **Fusion peptides and the mechanism of viral fusion.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1614**:116-121.
- Epstein JH, Field HE, Luby S, Pulliam JR, Daszak P: **Nipah virus: impact, origins, and causes of emergence.** *Curr Infect Dis Rep* 2006, **8**:59-65.

- Epstein JH, Prakash V, Smith CS, Daszak P, McLaughlin AB, Meehan G, Field HE, Cunningham AA: **Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1309-1311.
- Field HE, Barratt PC, Hughes RJ, Shield J, Sullivan ND: **A fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features.** *Aust Vet J* 2000, **78**:279-280.
- Field H, de Jong C, Melville D, Smith C, Smith I, Broos A, Kung YH, McLaughlin A, Zeddeman A: **Hendra virus infection dynamics in Australian fruit bats.** *PLoS One* 2011, **6**:e28678.
- Field H, Young P, Yob JM, Mills J, Hall L, Mackenzie J: **The natural history of Hendra and Nipah viruses.** *Microbes Infect* 2001, **3**:307-314.
- Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA: **Henipavirus susceptibility to environmental variables.** *Virus Res* 2008, **132**:140-144.
- Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD: **Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells.** *Dev Biol* 2001, **230**:151-160.
- Geisbert TW, Mire CE, Geisbert JB, Chan YP, Agans KN, Feldmann F, Fenton KA, Zhu Z, Dimitrov DS, Scott DP, et al: **Therapeutic treatment of Nipah virus infection in nonhuman primates with a neutralizing human monoclonal antibody.** *Sci Transl Med* 2014, **6**:242ra282.
- George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O'Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, Stanley TR, Ellison LE, Rupprecht CE: **Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:10208-10213.
- Goldsmith CS, Whistler T, Rollin PE, Ksiazek TG, Rota PA, Bellini WJ, Daszak P, Wong KT, Shieh WJ, Zaki SR: **Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches.** *Virus Res* 2003, **92**:89-98.
- Guillaume V, Aslan H, Ainouze M, Guerbois M, Wild TF, Buckland R, Langedijk JP: **Evidence of a potential receptor-binding site on the Nipah virus G protein (NiV-G): identification of globular head residues with a role in fusion promotion and their localization on an NiV-G structural model.** *J Virol* 2006, **80**:7546-7554.
- Guillaume V, Lefevre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R, Lam SK, Wild TF, Deubel V: **Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan).** *J Virol Methods* 2004, **120**:229-237.
- Gurley ES, Montgomery JM, Hossain MJ, Bell M, Azad AK, Islam MR, Molla MA, Carroll DS, Ksiazek TG, Rota PA, et al: **Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1031-1037.
- Halpin K, Bankamp B, Harcourt BH, Bellini WJ, Rota PA: **Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay.** *J Gen Virol* 2004, **85**:701-707.
- Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, Epstein JH, Rahman SA, Hughes T, Smith C, Field HE, et al: **Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**:946-951.
- Halpin K, Young PL, Field HE, Mackenzie JS: **Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus.** *J Gen Virol* 2000, **81**:1927-1932.
- Halpin K, Young PL, Field H, Mackenzie JS: **Newly discovered viruses of flying foxes.** *Vet Microbiol* 1999, **68**:83-87.

- Harcourt BH, Lowe L, Tamin A, Liu X, Bankamp B, Bowden N, Rollin PE, Comer JA, Ksiazek TG, Hossain MJ, et al: **Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1594-1597.
- Harcourt BH, Tamin A, Halpin K, Ksiazek TG, Rollin PE, Bellini WJ, Rota PA: **Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus.** *Virology* 2001, **287**:192-201.
- Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, Bellini WJ, Rota PA: **Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus.** *Virology* 2000, **271**:334-349.
- Hayman DT, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, Wood JL, Cunningham AA: **Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats.** *PLoS One* 2008, **3**:e2739.
- Hayman DT, Wang LF, Barr J, Baker KS, Suu-Ire R, Broder CC, Cunningham AA, Wood JL: **Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in Ghana, West Africa.** *PLoS One* 2011, **6**:e25256.
- Hess IM, Massey PD, Walker B, Middleton DJ, Wright TM: **Hendra virus: what do we know?** *N S W Public Health Bull* 2011, **22**:118-122.
- Hetz C: **The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:89-102.
- Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD, Ali MM, Ksiazek TG, Kuzmin I, Niezgoda M, Rupprecht C, Bresee J, Breiman RF: **Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2082-2087.
- Hüther J: **Activation of the unfolded protein response by henipavirus glycoproteins.** 2017. (Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg)
- Hyatt AD, Zaki SR, Goldsmith CS, Wise TG, Hengstberger SG: **Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals.** *Microbes Infect* 2001, **3**:297-306.
- Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, Faure C, Georges-Courbot MC, Rousset D, Reynes JM: **Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:159-161.
- Jansens A, van Duijn E, Braakman I: **Coordinated nonvectorial folding in a newly synthesized multidomain protein.** *Science* 2002, **298**:2401-2403.
- Jardetzky TS, Lamb RA: **Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry.** *Curr Opin Virol* 2014, **5**:24-33.
- Kashiwazaki Y, Kanitpun R, Suteeraparp P, Boonchit S: **A preliminary comparative study of a dipstick colloidal dye immunoassay and two antigen-detection ELISAs for diagnosis of Trypanosoma evansi infection in cattle.** *Vet Res Commun* 2000, **24**:533-544.
- Khan MS, Hossain J, Gurley ES, Nahar N, Sultana R, Luby SP: **Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: implications for preventing Nipah virus transmission.** *Ecohealth* 2010, **7**:517-525.
- Krüger N, Hoffmann M, Drexler JF, Müller MA, Corman VM, Drosten C, Herrler G: **Attachment protein G of an African bat henipavirus is differentially restricted in chiropteran and nonchiropteran cells.** *J Virol* 2014, **88**:11973-11980.
- Krüger N, Hoffmann M, Weis M, Drexler JF, Müller MA, Winter C, Corman VM, Gützkow T, Drosten C, Maisner A, Herrler G: **Surface glycoproteins of an African henipavirus induce syncytium formation in a cell line derived from an African fruit bat, Hypsignathus monstrosus.** *J Virol* 2013, **87**:13889-13891.
- Kullander K, Klein R: **Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling.** *Nat Rev Mol*

- Cell Biol* 2002, **3**:475-486.
- Kyhse-Andersen J: **Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.** *J Biochem Biophys Methods* 1984, **10**:203-209.
- Lam CW, AbuBakar S, Chang LY: **Identification of the cell binding domain in Nipah virus G glycoprotein using a phage display system.** *J Virol Methods* 2017, **243**:1-9.
- Lamb RA und Kolakofsky, D.: **Paramyxoviridae: The viruses and their replication.**, vol. 4. pp. 1305-1340: Fields Virology; 2001:1305-1340.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS: **Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures.** *Virology* 2006, **344**:30-37.
- Lamp B, Dietzel E, Kolesnikova L, Sauerhering L, Erbar S, Weingartl H, Maisner A: **Nipah virus entry and egress from polarized epithelial cells.** *J Virol* 2013, **87**:3143-3154.
- Lawrence P, Escudero Pérez B, Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Drosten C, Volchkov V: **Surface glycoproteins of the recently identified African Henipavirus promote viral entry and cell fusion in a range of human, simian and bat cell lines.** *Virus Res* 2014, **181**:77-80.
- Lee B, Pernet O, Ahmed AA, Zeltina A, Beaty SM, Bowden TA: **Molecular recognition of human ephrinB2 cell surface receptor by an emergent African henipavirus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:E2156-2165.
- Li Y, Wang J, Hickey AC, Zhang Y, Wu Y, Zhang H, Yuan J, Han Z, McEachern J, Broder CC, et al: **Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1974-1976.
- Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulton E: **Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:9557-9561.
- Liu Q, Bradel-Tretheway B, Monreal AI, Saludes JP, Lu X, Nicola AV, Aguilar HC: **Nipah virus attachment glycoprotein stalk C-terminal region links receptor binding to fusion triggering.** *J Virol* 2015, **89**:1838-1850.
- Lo MK, Miller D, Aljofan M, Mungall BA, Rollin PE, Bellini WJ, Rota PA: **Characterization of the antiviral and inflammatory responses against Nipah virus in endothelial cells and neurons.** *Virology* 2010, **404**:78-88.
- Luby SP, Gurley ES, Hossain MJ: **Transmission of human infection with Nipah virus.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**:1743-1748.
- Luby SP, Hossain MJ, Gurley ES, Ahmed BN, Banu S, Khan SU, Homaira N, Rota PA, Rollin PE, Comer JA, et al: **Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001-2007.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:1229-1235.
- Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM, Gurley E, Khan R, Ahmed BN, Rahman S, Nahar N, et al: **Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:1888-1894.
- Maar D, Harmon B, Chu D, Schulz B, Aguilar HC, Lee B, Negrete OA: **Cysteines in the stalk of the nipah virus G glycoprotein are located in a distinct subdomain critical for fusion activation.** *J Virol* 2012, **86**:6632-6642.
- Marsh GA, de Jong C, Barr JA, Tachedjian M, Smith C, Middleton D, Yu M, Todd S, Foord AJ, Haring V, et al: **Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002836.
- Marsh GA, Haining J, Hancock TJ, Robinson R, Foord AJ, Barr JA, Riddell S, Heine HG, White JR, Crameri G, et al: **Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/horse/2008/Redlands.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:2232-2238.
- McMurray DN, Stroud J, Murphy JJ, Carlomagno MA, Greer DL: **Role of immunoglobulin**

- classes in experimental histoplasmosis in bats.** *Dev Comp Immunol* 1982, **6**:557-567.
- Middleton DJ, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, Westbury HA, Halpin K, Daniels PW: **Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*).** *J Comp Pathol* 2007, **136**:266-272.
- Middleton DJ, Westbury HA, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, Hyatt AD: **Experimental Nipah virus infection in pigs and cats.** *J Comp Pathol* 2002, **126**:124-136.
- Mire CF, Geisbert JB, Agans KN, Feng YR, Fenton KA, Bossart KN, Yan L, Chan YP, Broder CC, Geisbert TW: **A Recombinant Hendra Virus G Glycoprotein Subunit Vaccine Protects Nonhuman Primates against Hendra Virus Challenge.** *J Virol* 2014, **88**(9): 4624–4631.
- Modrow S, Falke D, Truyen U: **Molekulare Virologie.** Spektrum Akademischer Verlag; 2003.
- Mohd Nor MN, Gan CH, Ong BL: **Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia.** *Rev Sci Tech* 2000, **19**:160-165.
- Moll M, Diederich S, Klenk HD, Czub M, Maisner A: **Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site.** *J Virol* 2004, **78**:9705-9712.
- Montgomery JM, Hossain MJ, Gurley E, Carroll GD, Croisier A, Bertherat E, Asgari N, Formenty P, Keeler N, Comer J, et al: **Risk factors for Nipah virus encephalitis in Bangladesh.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1526-1532.
- Moratelli R, Calisher CH: **Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015, **110**:1-22.
- Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Halpin K, Bingham J, Eaton BT, Broder CC: **Vertical transmission and fetal replication of Nipah virus in an experimentally infected cat.** *J Infect Dis* 2007, **196**:812-816.
- Murphy F, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabriel SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD: **Virus taxonomy, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.** Springer-Verlag; 1995.
- Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Westbury H, Hiley L, Selvey L, Rodwell B: **A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans.** *Science* 1995, **268**:94-97.
- Negrete OA, Chu D, Aguilar HC, Lee B: **Single amino acid changes in the Nipah and Hendra virus attachment glycoproteins distinguish ephrinB2 from ephrinB3 usage.** *J Virol* 2007, **81**:10804-10814.
- Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, Tajyar S, Lee B: **EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus.** *Nature* 2005, **436**:401-405.
- O' Brien J: **Bats of the Western Indian Ocean Islands.** pp. 259-290: Animals; 2011:259-290.
- O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DT, Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JL: **Bat flight and zoonotic viruses.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**:741-745.
- O'Sullivan JD, Allworth AM, Paterson DL, Snow TM, Boots R, Gleeson LJ, Gould AR, Hyatt AD, Bradfield J: **Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses.** *Lancet* 1997, **349**:93-95.

- Pager CT, Craft WW, Patch J, Dutch RE: **A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L.** *Virology* 2006, **346**:251-257.
- Pager CT, Dutch RE: **Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein.** *J Virol* 2005, **79**:12714-12720.
- Parashar UD, Sunn LM, Ong F, Mounts AW, Arif MT, Ksiazek TG, Kamaluddin MA, Mustafa AN, Kaur H, Ding LM, et al: **Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia.** *J Infect Dis* 2000, **181**:1755-1759.
- Parodi AJ: **Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation.** *Biochem J* 2000, **348 Pt 1**:1-13.
- Patch JR, Han Z, McCarthy SE, Yan L, Wang LF, Harty RN, Broder CC: **The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding.** *Virol J* 2008, **5**:137.
- Peel AJ, Baker KS, Crameri G, Barr JA, Hayman DT, Wright E, Broder CC, Fernández-Loras A, Fooks AR, Wang LF, et al: **Henipavirus neutralising antibodies in an isolated island population of African fruit bats.** *PLoS One* 2012, **7**:e30346.
- Pernet O, Beaty S, Lee B: **Functional rectification of the newly described African henipavirus fusion glycoprotein (Gh-M74a).** *J Virol* 2014, **88**:5171-5176.
- Pernet O, Wang YE, Lee B: **Henipavirus receptor usage and tropism.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2012, **359**:59-78.
- Plattet P and Plemper RK: **Envelope protein dynamics in paramyxovirus entry.** *MBio* 2013, **4**.
- Plemper RK, Brindley MA, Iorio RM: **Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002058.
- Ploquin A, Szécsi J, Mathieu C, Guillaume V, Barateau V, Ong KC, Wong KT, Cosset FL, Horvat B, Salvetti A: **Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines.** *J Infect Dis* 2013, **207**:469-478.
- Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG: **Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly.** *Dev Cell* 2004, **7**:465-480.
- Popa A, Pager CT, Dutch RE: **C-terminal tyrosine residues modulate the fusion activity of the Hendra virus fusion protein.** *Biochemistry* 2011, **50**:945-952.
- Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, Ellison JA, Gilbert AT, Kuzmin IV, Niezgodna M, et al: **Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:8194-8199.
- Remaley AT, Ugorski M, Wu N, Litzky L, Burger SR, Moore JS, Fukuda M, Spitalnik SL: **Expression of human glycophorin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells. Role of N- and O-linked glycosylation in cell surface expression.** *J Biol Chem* 1991, **266**:24176-24183.
- Richter HV und Cumming GS: **First application of satellite telemetry to track African straw-coloured fruit bat migration.**, vol. 275. pp. 172–176: *J. Zool.*; 2006:172–176.
- Rissanen I, Ahmed AA, Azarm K, Beaty S, Hong P, Nambulli S, Duprex WP, LeeB, Bowden TA: **Idiosyncratic Mòjiāng virus attachment glycoprotein directs a host-cell entry pathway distinct from genetically related henipaviruses.** *Nat. Commun* 2017, **8**:16060
- Rockx B, Bossart KN, Feldmann F, Geisbert JB, Hickey AC, Brining D, Callison J, Safronetz D, Marzi A, Kercher L, et al: **A novel model of lethal Hendra virus infection in African**

- green monkeys and the effectiveness of ribavirin treatment.** *J Virol* 2010, **84**:9831-9839.
- Rockx B, Winegar R, Freiberg AN: **Recent progress in henipavirus research: molecular biology, genetic diversity, animal models.** *Antiviral Res* 2012, **95**:135-149.
- Sarkar SK, Chakravarty AK: **Analysis of immunocompetent cells in the bat, *Pteropus giganteus*: isolation and scanning electron microscopic characterization.** *Dev Comp Immunol* 1991, **15**:423-430.
- Schröder M, Kaufman RJ: **ER stress and the unfolded protein response.** *Mutat Res* 2005, **569**:29-63.
- Selvey L, Taylor R, Arklay A, Gerard J: **Screening of bat carers for antibodies to equine morbillivirus.** vol. 20. pp. 477–478. *Commun Dis Intell*; 1996:477–478.
- Selvey LA, Wells RM, McCormack JG, Ansford AJ, Murray K, Rogers RJ, Lavercombe PS, Selleck P, Sheridan JW: **Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus.** *Med J Aust* 1995, **162**:642-645.
- Selvey L, Sheridan J: **Outbreak of Severe Respiratory Disease in Humans and Horses Due to a Previously Unrecognized Paramyxovirus.** *J Travel Med* 1995, **2**:275.
- Seth RB, Sun L, Chen ZJ: **Antiviral innate immunity pathways.** *Cell Res* 2006, **16**:141-147.
- Shental-Bechor D, Levy Y: **Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:8256-8261.
- Shirai J, Sohayati AL, Mohamed Ali AL, Suriani MN, Taniguci T, Sharifah SH: **Nipah virus survey of flying foxes in Malaysia.** vol. 41. pp. 69-78: *JARQ*; 2007:69-78.
- Smith I, Broos A, de Jong C, Zeddeman A, Smith C, Smith G, Moore F, Barr J, Crameri G, Marsh G, et al: **Identifying Hendra virus diversity in pteropid bats.** *PLoS One* 2011, **6**:e25275.
- Steffen DL, Xu K, Nikolov DB, Broder CC: **Henipavirus mediated membrane fusion, virus entry and targeted therapeutics.** *Viruses* 2012, **4**:280-308.
- Stone JA, Vemulapati BM, Bradel-Tretheway B, Aguilar HC: **Multiple Strategies Reveal a Bidentate Interaction between the Nipah Virus Attachment and Fusion Glycoproteins.** *J Virol* 2016, **90**:10762-10773.
- Sulkin SE, Allen R: **Virus infections in bats.** *Monogr Virol* 1974, **8**:1-103.
- Tamin A, Harcourt BH, Ksiazek TG, Rollin PE, Bellini WJ, Rota PA: **Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus.** *Virology* 2002, **296**:190-200.
- Tan KS, Tan CT, Goh KJ: **Epidemiological aspects of Nipah virus infection.** vol. 4. pp. 77-81: *Neurol. J. Southeast Asia*:77-81.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: **Concepts and principles of O-linked glycosylation.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998, **33**:151-208.
- Vogt C, Eickmann M, Diederich S, Moll M, Maisner A: **Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins.** *J Virol* 2005, **79**:3865-3872.
- von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J: **Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication.** *J Hepatol* 2010, **53**:797-804.
- Vulliémoz D and Roux L: **"Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count?** *J Virol* 2001, **75**:4506-4518.
- Walpita P, Peters CJ: **Cis-acting elements in the antigenomic promoter of Nipah virus.** *J Gen Virol* 2007, **88**:2542-2551.

- Wang L.F., Yu M., Hansson E., Pritchard L.I., Shiell B., Michalski W.P., Eaton B.T.: **The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae.** vol. 74. pp. 9972-9979: *J Virol.*; 2000:9972-9979.
- Wang LF, Walker PJ, Poon LL: **Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses?** *Curr Opin Virol* 2011, **1**:649-657.
- Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, Bellini WJ, Eaton BT: **Molecular biology of Hendra and Nipah viruses.** *Microbes Infect* 2001, **3**:279-287.
- Wang YE, Park A, Lake M, Pentecost M, Torres B, Yun TE, Wolf MC, Holbrook MR, Freiberg AN, Lee B: **Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding.** *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1001186.
- Wang Z and Iorio RM: **Amino acid substitutions in a conserved region in the stalk of the Newcastle disease virus HN glycoprotein spike impair its neuraminidase activity in the globular domain.** *J Gen Virol* 1999, **80** (Pt 3):749-753.
- Wang Z, Mirza AM, Li J, Mahon PJ, Iorio RM: **An oligosaccharide at the C-terminus of the F-specific domain in the stalk of the human parainfluenza virus 3 hemagglutinin-neuraminidase modulates fusion.** *Virus Res* 2004, **99**:177-185.
- Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet JC, Roth JA, Czub M: **Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge.** *J Virol* 2006, **80**:7929-7938.
- Weingartl H, Czub S, Copps J, Berhane Y, Middleton D, Marszal P, Gren J, Smith G, Ganske S, Manning L, Czub M: **Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus.** *J Virol* 2005, **79**:7528-7534.
- Weis M: **Funktionelle Charakterisierung der Glykoproteine eines neu entdeckten afrikanischen Henipavirus.**; 2014. (Dissertation, Philipps-Universität Marburg)
- Weis M, Behner L, Binger T, Drexler JF, Drosten C, Maisner A: **Fusion activity of African henipavirus F proteins with a naturally occurring start codon directly upstream of the signal peptide.** *Virus Res* 2015, **201**:85-93.
- Weis M, Behner L, Hoffmann M, Krüger N, Herrler G, Drosten C, Drexler JF, Dietzel E, Maisner A: **Characterization of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins.** *J Gen Virol* 2014, **95**:539-548.
- Weise C, Erbar S, Lamp B, Vogt C, Diederich S, Maisner A: **Tyrosine residues in the cytoplasmic domains affect sorting and fusion activity of the Nipah virus glycoproteins in polarized epithelial cells.** *J Virol* 2010, **84**:7634-7641.
- Weiss S, Nowak K, Fahr J, Wibbelt G, Mombouli JV, Parra HJ, Wolfe ND, Schneider BS, Leendertz FH: **Henipavirus-related sequences in fruit bat bushmeat, Republic of Congo.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:1536-1537.
- Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Westbury HA, Slocombe RF: **Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*).** *J Comp Pathol* 2000, **122**:201-207.
- Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M, Bernard A, Loth P, Georges-Courbot MC, Chevallier M, Akaoka H, et al: **A golden hamster model for human acute Nipah virus infection.** *Am J Pathol* 2003, **163**:2127-2137.
- Wong KT, Shieh WJ, Zaki SR, Tan CT: **Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis.** *Springer Semin Immunopathol* 2002, **24**:215-228.
- Wu Z, Yang L, Yang F, Ren X, Jiang J, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhou H, Jin Q: **Novel Henipa-like virus, Mojiang Paramyxovirus, in rats, China, 2012.** *Emerg Infect Dis* 2014,

- 20:1064-1066.
- Xu K, Chan YP, Rajashankar KR, Khetawat D, Yan L, Kolev MV, Broder CC, Nikolov DB: **New insights into the Hendra virus attachment and entry process from structures of the virus G glycoprotein and its complex with Ephrin-B2.** *PLoS One* 2012, **7**:e48742.
- Xu K, Rajashankar KR, Chan YP, Himanen JP, Broder CC, Nikolov DB: **Host cell recognition by the henipaviruses: crystal structures of the Nipah G attachment glycoprotein and its complex with ephrin-B3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:9953-9958.
- Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T: **Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**:439-441.
- Young PL, Halpin K, Selleck PW, Field H, Gravel JL, Kelly MA, Mackenzie JS: **Serologic evidence for the presence in *Pteropus* bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus.** *Emerg Infect Dis* 1996, **2**:239-240.
- Yu M, Hansson E, Langedijk JP, Eaton BT, Wang LF: **The attachment protein of Hendra virus has high structural similarity but limited primary sequence homology compared with viruses in the genus Paramyxovirus.** *Virology* 1998, **251**:227-233.
- Yun T, Park A, Hill TE, Pernet O, Beaty SM, Juelich TL, Smith JK, Zhang L, Wang YE, Vigant F, Gao J, Wu P, Lee B, Freiberg AN: **Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of henipavirus infection.** *J Virol.* 2015 Jan 15;89(2):1242-53.
- Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, et al: **Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity.** *Science* 2013, **339**:456-460.
- Zhu Q, Biering SB, Mirza AM, Grasseschi BA, Mahon PJ, Lee B, Aguilar HC, Iorio RM: **Individual N-glycans added at intervals along the stalk of the Nipah virus G protein prevent fusion but do not block the interaction with the homologous F protein.** *J Virol* 2013, **87**:3119-3129.
- Zimmermann L: **Bedeutung von Cysteinen für die Oligomerisierung und den Transport des Glykoproteins eines afrikanischen Henipavirus.** 2015. (Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg)

Verzeichnis der verwendeten Internetquellen

<http://www.who.int/csr/disease/hendra/en/> (Stand 01.09.2017)

A <http://www.horsecouncil.org.au/wpcontent/uploads/pdffdocs/Your%20Hendra%20Virus%20Vaccine%20Questions%20Answered.%20EVA.%20Feb2013.pdf> (Stand 01.09.2017)

B <http://www.horsecouncil.org.au/hendra/hendra-virus-vaccine-questions-answered/> (Stand 01.09.2017)

http://www.who.int/csr/disease/nipah/Global_NiphaandHendraRisk_20090510.png (Stand 01.09.2017)

<http://nebasechanger.neb.com> (Stand 01.09.2017)

http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html (Stand 01.09.2017)

<https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit#product-protocols> (Stand 01.09.2017)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21335> (Stand 01.09.2017)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21331> (Stand 01.09.2017)

Anhang

A1 Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL4	<i>biosafety level 4</i>
CD	zytoplasmatische Domäne
CedV	Cedarvirus
C-Terminus	Carboxyterminus
CTSB	Cathepsin B
CTSL	Cathepsin L
Da	Dalton
def	<i>deficient</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EB2	Ephrin B2
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Fusionsprotein
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kalberserum
G	Glykoprotein

HeLa	Henrietta Lacks
HeV	Hendravirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz (-analyse)
Ig (IgG)	Immunglobulin (Ig Klasse G)
kb	Kilobasenpaare
KV	Kumasivirus
L	Polymerase
LB	<i>Liquid Broth</i>
μ	Mikro
m	Meter
M	Matrixprotein
M	molar (mol/l)
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> Zellen
ME	Mercaptoethanol
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mol	Mol
MojV	Mojiangvirus
mRNA	Messenger RNA
MOI	Multiplicity of infection
N	Nukleoprotein
NC	Nitrozellulose
NiV	Nipahvirus
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
P	Phosphoprotein
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFA	Paraformaldehyd
p.i.	nach Infektion
pre-SP	pre-Signalpeptid
p.t.	nach Transfektion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomane
U	<i>units</i>
ü.N.	über Nacht
VLP	<i>virus-like particle</i>
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

A2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der Henipaviren.....	5
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des Genomaufbaus von Henipaviren.....	6
Abb. 1.3:	Geographische Verbreitung der Henipavirus-Ausbrüche und der Flughunde der Familie der <i>Pteropodidae</i>	13
Abb. 1.4:	Eine Kolonie der Flughunde <i>Eidolon helvum</i> im Zoologischen Garten in Kumasi, Ghana (Westafrika).....	14
Abb. 1.5:	Phylogenetischer Stammbaum der Henipaviren basierend auf der Sequenzanalyse der L-Gen-Fragmente.....	15
Abb. 1.6:	Genomstruktur und Aminosäurevergleich der einzelnen Proteine zwischen Hendra-, Nipah- und Kumasivirus.....	17
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung des henipaviralen Fusionsproteins am Beispiel von NiV-F (A) und KV-F (B).....	19
Abb. 1.8:	Kristallstruktur der globulären Kopfdomäne des NiV-Glykoproteins.....	20
Abb. 1.9:	Modell der Oligomerisierung des NiV-G Proteins.....	21
Abb. 1.10:	Modell der G- und F-Interaktion zur Einleitung der Virus-Zell-Fusion.....	23
Abb. 1.11:	Schematische Darstellung der henipaviralen Glykoproteine am Beispiel von NiV-G (A) und KV-G (B).....	24

Abb. 1.12:	Schematische Darstellung des henipaviralen Replikationszyklus, mit Fokus auf die Rolle der G- und F-Proteine.....	26
Tab. 1.1:	Vergleich der Aminosäuren- und DNA-Sequenzen von Ephrin-B2 und -B3 in verschiedenen Säugetierspezies.....	27
Abb. 2.1:	Nachweis der Synzytienbildung in NiV- und KV-Glykoprotein transfizierten Vero76-Zellen.....	30
Abb. 2.2:	Nachweis und Vergleich der intrazellulären Expression und der Oberflächenexpression der NiV-G und KV-G Proteine.....	31
Abb. 2.3:	Quantitativer Nachweis der Gesamtexpression und Oberflächenexpression der NiV-G und KV-G Proteine in Vero76-Zellen (FACS-Analyse).....	33
Abb. 2.4:	Intrazelluläre Lokalisation der KV-G und NiV-G Proteine.....	35
Abb. 2.5:	Intrazelluläre Kolokalisation der KV-G und NiV-G Proteine.....	36
Abb. 2.6:	Schematische Darstellung der Prozessierung von N-Glykanen.....	37
Abb. 2.7:	Endoglykosidase-Behandlung von radioaktiv markierten NiV-G und KV-G Proteinen.....	39
Abb. 2.8:	Gesamtexpression der KV-G N-Glykosylierungsmutanten im Zelllysat..	40
Abb. 2.9:	Schematische Darstellung der potentiellen und tatsächlichen N-Glykosylierungsstellen im KV-G Protein.....	41
Abb. 2.10:	Relative Oberflächenexpression der KV-G N-Glykosylierungsmutanten.....	42

Abb. 2.11:	Heterotypischer Fusionsassay der KV-G N-Glykosylierungsmutanten in Vero76-Zellen.....	43
Abb. 2.12:	Aminosäuresequenzvergleich der KV-G und NiV-G Stiel­domänen und schematische Darstellung des KV-G Proteins.....	44
Abb. 2.13:	Expression der oligomeren Formen von KV-G und NiV-G.....	45
Abb. 2.14:	Nachweis der Expression der oligomeren Formen von KV-G und NiV-G mittels <i>Pulse Chase</i> -Analyse.....	46
Abb. 2.15:	Schematische Darstellung der hergestellten Cystein-Stiel­domänen-Mutanten des KV-G Proteins.....	47
Abb. 2.16:	Nachweis der Gesamt- und der Oberflächenexpression der Cystein-Stiel­domänen-Mutanten des KV-G Proteins.....	48
Abb. 2.17:	Heterotypischer Fusionsassay der KV-G Cystein-Stiel­domänen-Mutanten.....	50
Abb. 2.18:	Co-Immunfärbung des KV-G Wildtyp Proteins und der Cystein-Stiel­domänen-Mutanten auf der Zelloberfläche durch HA _{tag} spezifische Antikörper und lösliche NiV-Rezeptoren (Ephrin-B2/Fc).....	52
Abb. 2.19:	Vergleich der Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen von NiV-G und KV-G.....	53
Abb. 2.20:	Untersuchung der Endozytose des KV-G Proteins und der Y38A Mutante mittels <i>antibody uptake</i> Assay.....	54
Abb. 2.21:	Einfluss von Chlorpromazin auf die Endozytose des KV-G Proteins.....	55
Abb. 2.22:	Endozytose von NiV-F und KV-G in Koexpression.....	56

Abb. 2.23:	Quantifizierung der Endozytose-Rate des KV-G Wildtyp-Proteins und der KV-G Endozytose-Mutante mittels „MESNA-Reduktion“.....	58
Abb. 2.24:	Gesamt- und Oberflächenexpression des KV-G Wildtyp Proteins und der Endozytose-Mutante KV-G _{Y38A}	60
Abb. 2.25:	Heterotypischer Fusionsassay der KV-G _{Y38A} Mutante.....	61
Abb. 2.26:	Nachweis der Oberflächenexpression sowie der Funktionshelferfunktion mittels heterotypischem Fusionsassay der KV-G _{C314S} Mutante in Vero76-Zellen.....	62
Abb. 2.27:	Heterotypischer Fusionsassay der KV-G _{Y38A+C314S} Mutante in Vero76-Zellen.....	63
Abb. 5.1:	Schematischer Ablauf der Q5 <i>Site-Directed</i> Mutagenese.....	97
Abb. 5.2:	Prinzip des <i>Antibody Uptake</i> Assays.....	104
Abb. 5.3:	Struktur von Sulfo-NHS-LC-Biotin mit wichtigen Moleküldomänen.....	106
Abb. 5.4:	Struktur von Sulfo-NHS-SS-Biotin.....	107
Abb. 5.5:	Prinzip der MESNA-Reduktion.....	108
Abb. 5.6:	Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blot.....	112
Abb. 5.7:	Schematischer Aufbau der Durchflusszytometrie.....	115

A3 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Behner L, Zimmermann L, Ringel M, Weis M and Maisner A. (2017) **Influence of oligomerization, glycosylation and endocytosis on the bioactivity of an African bat henipavirus G protein with unknown zoonotic potential.** Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Hoffmann M, Nehlmeier I, Brinkmann C, Krähling V, **Behner L**, Dietzel E, Moldenhauer AS, Maisner A, Becker S and Pöhlmann S. (2017) **Fruit bat tetherin is resistant to counteraction by the Ebola virus glycoprotein and is required for robust inhibition of viral infection by interferon.** Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Ringel M, Halwe S, Heiner A, **Behner L**, Sauerhering S, Becker N, Weis M, Dietzel E, Kolesnikowa L, Becker S, Von Messling V and Maisner A. (2017) **Nipah virus nucleocapsid transport to the cell periphery requires functional matrix proteins and intact actin filaments.** Manuskript in Vorbereitung

Sauerhering L, Müller H, **Behner L**, Elvert M, Fehling SK, Strecker T and Maisner A. (2017) **Variability of Interferon- λ induction and antiviral activity in Nipah virus infected differentiated human bronchial epithelial cells of two human donors.** *Submitted, J Gen Virol. 2017*

Sauerhering L, Zickler M, Elvert M, **Behner L**, Matrosovich T, Erbar S, Matrosovich M and Maisner A. (2016) **Species-specific and individual differences in Nipah virus replication in porcine and human airway epithelial cells.** *J Gen Virol. 2016 Jul;97(7):1511-9.*

Weis M, **Behner L**, Binger T, Drexler JF, Drosten C. and Maisner A. (2015) **Fusion activity of African henipavirus F proteins with a naturally occurring start codon directly upstream of the signal peptide.** *Virus Research 2015 Apr 2; 201:85-93.*

Weis M, **Behner L**, Hoffmann M, Krüger N, Herrler G, Drosten C, Drexler JF, Dietzel E and Maisner A. (2014) **Characterization of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins.** *J Gen Virol. 2014 Mar;95(Pt 3):539-48.*

Präsentationen

Poster

Behner L and Maisner A (2017) **African bat henipavirus G protein contains a functional endocytosis motif.** 27th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Marburg, Germany

Hüther J, **Behner L**, Rohde C, Krähling V, Ringel M and Maisner A (2017): **Induction of the unfolded protein response by Henipavirus glycoproteins.** 27th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Marburg, Germany

Hüther J, **Behner L**, Rohde C, Krähling V, Ringel M and Maisner A (2017): **Henipavirus glycoproteins induce the unfolded protein response.** 68. Mosbacher Kolloquium – „Cell Organelles – Origin, Dynamics, Communication“, Mosbach, Germany

Behner L, Wittwer K and Maisner A (2016) **African bat henipavirus GH-M74a glycoprotein: Study on the functional importance of N glycans.** 26th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Münster, Germany

Weis M, **Behner L**, Drosten C, Drexler JF and Maisner A (2014) **Glycoproteins of a novel African bat henipavirus with limited biological activity.** ASV Meeting 2014, Fort Collins, USA

Weis M, **Behner L**, Drosten C, Drexler JF and Maisner A (2014) **African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins have impaired fusogenic properties.** BatID Meeting 2014, Fort Collins, USA

Behner L, Weis M, Drosten C, Drexler JF, Maisner A (2014) **Impaired biological activities of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins.** Joint International Symposium on Mechanisms of cellular compartmentalization Collaborative Research Center SFB 593 and Graduate School GRK 1216, 2014, Marburg, Germany

Vorträge

Hoffmann M, Nehlmeier I, Brinkmann C, Krähling V, **Behner L**, Dietzel E, Moldenhauer AS, Maisner A, Becker S and Pöhlmann S. (2017) **Fruit bat tetherin (BST-2, CD317) is a potent innate immune factor that inhibits spread of highly pathogenic viruses in bat cells.** European Meeting on Viral Zoonoses, St. Raphael, France

Hoffmann M, Nehlmeier I, Brinkmann C, Krähling V, **Behner L**, Dietzel E, Paijo J, Kalinke U, González Hernández M, Crone L, Moldenhauer AS, Maisner A, Becker S and Pöhlmann S. (2017) **Novel insights into Ebola virus glycoprotein-driven cell entry and tetherin antagonism.** 9th International Filovirus Symposium, Marburg, Germany

Behner L and Maisner A. (2014) **Characterization of the newly identified African henipavirus-like GH-M74a glycoprotein G.** Graduate School 1216 Retreat, Rauischholzhausen, Germany

Weis M, **Behner L** and Maisner A (2014) **Characterization of African bat henipavirus GH-M74a fusion protein.** Graduate School 1216 „Intra- and intercellular transport and communication“, Marburg, Germany

Behner L, Weis M and Maisner A. (2014) **Characterization of the African henipavirus-like GH-M74a glycoprotein G.** Graduate School 1216 „Intra- and intercellular transport and communication“, Marburg, Germany

Weis M, **Behner L**, Drosten C, Drexler JF and Maisner A. (2013) **Functional characterization of a newly identified African bat Henipavirus fusion protein.** Klausurtagung des Sonderforschungsbereich 593, Kleinwalsertal, Austria

A4 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. Andrea Maisner bedanken, dass ich in Ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen durfte, für das Überlassen dieses interessanten Themas und ganz besonders für Ihre wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Stephan Becker danke ich für das sehr gute Arbeitsklima am Institut für Virologie.

Allen Mitgliedern des SFB 1021 und vor allem des Graduierten Kollegs 1216 danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Finanzierung meiner Arbeit.

Danke an alle ehemaligen und jetzigen Mitglieder der AG Maisner für die freundliche und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die zuverlässige Hilfsbereitschaft.

Ein besonderes Dankeschön geht an Anja, die immer wieder für Ordnung und Sauberkeit im Labor sorgt und ohne die einfach nichts funktionieren würde. Du bist eben unersetzlich ;-)

Erik, Julian, Louisa, Lucie und Mareike und Michael danke ich für die schöne und lustige Zeit im coolsten Labor. Danke, dass ich gelegentlich meine Lieblingslieder hören durfte ;-). Euch und Marc danke ich ebenfalls für die amüsanten Kaffeepausen und Unternehmungen außerhalb der Arbeitszeit.

Ina, Lara, Lucie und Svenja danke ich für die wunderbaren und teilweise sehr lehrreichen Mädels-Abende und Wochenend-Trips. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann.

Bei Marc und Svenja möchte ich mich für die gemeinsamen Monate im Schreibraum bedanken.

Vielen Dank an Erik, Louisa, Lucie, Mareike und Marc für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Lucie für die Einarbeitung ins Hochsicherheitslabor und in dem Zusammenhang ebenfalls vielen Dank an das gesamte BSL-4 Team.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung der letzten Jahre danken.

Heiko, danke, dass du immer für mich da bist!

A5 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Einfluss gezielter Mutationen
auf die biologische Aktivität des Oberflächen-Glykoproteins
eines afrikanischen Henipavirus“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Laura Behner